

バレニクリンのうつ病・自殺のリスク要因
に関するトランスレーショナル研究

城西大学大学院薬学研究科

薬学専攻

秋元 勇人

目次

略語	・ ・ ・ 1
総論の部	・ ・ ・ 4
緒論	・ ・ ・ 4
第1章 バレニクリン使用時の自殺発現リスクの実態調査と自殺予防効果の 高い抗うつ薬の探索	・ ・ ・ 7
第1節 緒言	・ ・ ・ 7
第2節 バレニクリン使用時における、自殺予防効果の高い抗うつ薬の 検出	・ ・ ・ 11
第3節 バレニクリンとうつ病の増悪との関連性	・ ・ ・ 15
第4節 抗うつ薬使用症例と比較したバレニクリン使用症例の自殺関連 事象発現リスク	・ ・ ・ 17
第5節 考察と小括	・ ・ ・ 19
第2章 うつ病モデルラットの脳内メタボローム解析	・ ・ ・ 20
第1節 緒言	・ ・ ・ 20
第2節 ストレスが及ぼすラットの行動および海馬 BDNF への影響	・ ・ ・ 23
第3節 resilient ラットおよび susceptible ラットの脳内代謝物 プロファイル	・ ・ ・ 31

第4節	海馬組織における各脳内代謝物の変動	・・・34
第5節	考察	・・・39
第6節	小括	・・・43
第3章	バレニクリンが及ぼすラットの行動および脳内代謝物プロファイル への影響	・・・44
第1節	緒言	・・・44
第2節	バレニクリンが及ぼすラットの行動への影響	・・・46
第3節	バレニクリン投与ラットの脳内代謝物プロファイル	・・・48
第4節	バレニクリン慢性経口投与ラットの脳中バレニクリン濃度	・・・52
第5節	考察	・・・52
第6節	小括	・・・54
第4章	バレニクリンと各種禁煙補助薬の自殺関連事象発現タイミング から推定されるうつ病・自殺のリスク要因	・・・55
第1節	緒言	・・・55
第2節	各種禁煙補助薬の自殺関連事象発現タイミング	・・・57
第3節	考察と小括	・・・60
第5章	ニコチン退薬症候モデルラットの脳内メタボローム解析	・・・61
第1節	緒言	・・・61
第2節	ニコチン退薬症候モデルラットの作成	・・・63
第3節	ニコチン退薬症候モデルラットおよび退薬症候回復モデルラット	

のメタボローム解析	・ ・ ・ 67
第4節 ニコチン退薬症候モデルラットおよび退薬症候回復モデルラット	
の脳内代謝物変動	・ ・ ・ 70
第5節 考察	・ ・ ・ 73
第6節 小括	・ ・ ・ 76
結論	・ ・ ・ 77
謝辞	・ ・ ・ 82
主論文目録	・ ・ ・ 83
実験の部	・ ・ ・ 84
第1章 実験の部	・ ・ ・ 84
第2章 実験の部	・ ・ ・ 87
第3章 実験の部	・ ・ ・ 93
第4章 実験の部	・ ・ ・ 97
第5章 実験の部	・ ・ ・ 100
引用文献	・ ・ ・ 102

略語

本学位論文中に使用した略語について以下に記載する。

5-HT, 5-hydroxytryptamine

ADs, Antidepressants

ANOVA, Analysis of variance

ATP, Adenosine triphosphate

BCA, Bicinchoninic acid

BDNF, Brain derived neurotrophic factor

CI, Confidence interval

CMS, Chronic mild stress

CoA, Coenzyme A

Con, Control

COPD, Chronic obstructive pulmonary disease

CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill

cum, Cumulative

DSS-d6, Sodium-3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-d 6-sulfonate

EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid

FAERS, FDA adverse event reporting system

FDA, Food and Drug Administration

FID, Free induction decay

GABA, γ -aminobutyric acid

GAD, Glutamate decarboxylase

GC/MS, Gas chromatography/mass spectrometry

H₃PO₄, Phosphoric acid

HClO₄, Perchloric acid

HPLC, High performance liquid chromatography

HR-MAS, High resolution-magic angle spinning

ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for
Pharmaceuticals for Human Use

iROR, Integrated reporting odds ratio

LOD, Limit of detection

LOQ, Limit of quantification

MDD, Major depressive disorder

MedDRA/J, Medical Dictionary for Regulatory Activities/Japan

mRNA, Messenger ribonucleic acid

MW, Molecular weight

n.s., Not significant

NAA, N-Acetylaspartate

NaH₂PO₄, Sodium dihydrogen phosphate

Nic, Nicotine

NMR, Nuclear magnetic resonance

PC, Phosphocholine

PCA, Principal component analysis

PLS-DA, Partial least square-discriminant analysis

PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride

PS, Propensity score

PT, Preferred term

Res, Resilient

RIPA, Radioimmunoprecipitation assay

ROR, Reporting odds ratio

rTR, Reverse translational research

Sal, Saline

SD, Standard deviation

SDS, Sodium dodecyl sulfate

SEM, Standard error of the mean

SMQ, Standardised MedDRA Queries

SNRI, Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors

SRE, Suicide-related event

SSRI, Selective serotonin reuptake inhibitors

Str, Stress

Sus, Susceptible

TrkB, Tropomyosin-related kinase B

VAR, Varenicline

VIP, Variable importance in projection

WHO, World health organization

総論の部

緒論

現在、世界中のうつ病罹患者数は3億人を上回っている[1]。うつ病患者は、職場に出勤できない状態(absenteeism)、あるいは、出勤しても労働生産性が低い状態(presenteeism)を呈することから、うつ病が及ぼす経済的損失は大きい[2-4]。また、うつ病は自殺の主要なリスク要因であり、全世界の年間の自殺者数は80万人に及んでいる[1]。したがって、うつ病やうつ病に伴う自殺は社会的に大きな問題である。

薬物誘発性のうつ病や自殺に関しても社会的に大きな問題である。例えば、薬物誘発性のうつ病は、イギリス一国だけでも2000件以上報告されており、自殺に関しては1000件以上である[5]。加えて、従来抗うつ薬として臨床的に使用されてきたパロキセチンでさえも、臨床試験結果の再解析 (SmithKline Beecham's Study 329)により、placeboと比較し、有意に自殺リスクを高めることが明らかとなっている[6]。

うつ病や自殺リスクの高い薬物の一例として、 $\alpha_4\beta_2$ ニコチン性アセチルコリン受容体の部分作動薬であり、禁煙補助薬の1つであるバレニクリンが挙げられる。バレニクリンはブプロピオンやニコチン代替療法のような他の禁煙補助薬と比較し、禁煙成功率が高い薬物として知られている[7]。他方、バレニクリンと抑うつ状態や自殺念慮、自殺行動との関連が疑われたことから、米国 Food and Drug administration (FDA)は、バレニクリンの添付文書(label)を改訂した[8]。また、バレニクリンの使用は薬物誘発性うつ病の報告件数では第1位、薬物誘発性自殺の報告件数では非致死性の自殺行動で第2位、致死性の自殺行動で第6位である[5]。そのため、バレニクリンは禁煙成功率が高い薬物であるに

もかわらず、添付文書が改訂されて以降、その処方数は減少している[9]。しかしながら、バレニクリンによるうつ病や自殺の誘発リスクは placebo と変わらないという報告や、むしろうつ病のリスクを減少させるという報告もある[10,11]。上記のことから、バレニクリンにうつ病や自殺を誘発するリスクがあるか否かや、うつ病や自殺の主なリスク要因を調べることは重要である。

ある薬物にうつ病・自殺誘発リスクがあるかを非臨床的に評価するための手法は複数報告されている。例えば、Cavarec L.らは SH-SY5Y 細胞を用いて 5-HT_{2c} 受容体の mRNA editing を調べることで、ヒトインターフェロン α がうつ病や自殺を誘発する作用があるかを調べている(in vitro)[12]。In vivo においては、動物にレセルピンやインターフェロンを投与し、動物の行動を観察する行動評価や、うつ病の病態仮説の 1 つであるモノアミン欠乏仮説に則った脳中モノアミン濃度の測定、もう 1 つの病態仮説である脳由来神経栄養因子(BDNF)仮説に則った BDNF 測定を実施した報告もある[13-16]。現在臨床的に使用されている抗うつ薬はモノアミン欠乏仮説を前提として創薬されたが、うつ病患者の 10-30%は抗うつ薬に対して応答を示さないことが知られていることから[17]、既存の病態仮説に注目するだけではうつ病を十分に評価できない。

メタボローム解析とは、生体内低分子代謝物を包括的に解析すること、すなわち、生体のゲノム情報の実行結果である最下流を解析することである。メタボローム解析の対象となる代謝物は主として基幹代謝物であり、これらの代謝物は生物間で互換性を有する[18]。

ある化合物の抗うつ作用を調べるために、nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy や gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)のような分析機器を用いたメタボローム解析が利用されている[19,20]。メタボローム解析は、モノアミンのみならず、生体内の様々な代謝物を包括的に解析できることから、

既存の病態仮説に捉われずにうつ病を評価できる可能性がある。

薬物がうつ病や自殺を誘発するか否かを臨床試験で評価することは、評価指標(アウトカム)をうつ病や自殺に設定する必要があるため、困難である。近年、薬剤疫学研究や pharmacovigilance に代表される臨床的データマイニング研究で検出された副作用シグナルを基礎研究によって裏付けることにより、得られた知見のエビデンスレベルを高める手法として、reverse translational research (rTR)が注目されている[21,22]。

そこで著者は、バレニクリンをうつ病や自殺リスクのあるモデル薬物として設定し、臨床において、バレニクリン使用中における自殺の発現リスクがどれほど高いかを調査した(第1章)。次に、メタボローム解析が“うつ”と“非うつ”を判別可能であるかを調べることで、メタボローム解析がうつ病誘発リスクのある化合物を評価できるポテンシャルを持つかどうかを検討した(第2章)。第3章では、実際にバレニクリンをラットに投与することにより、そのラットがうつ病様行動を示すか、および、そのラットの脳内代謝物の変動がうつ病モデルラットとどれほど類似しているかを調べた。第3章において、バレニクリン投与ラットの行動や脳内代謝物の変動がうつ病モデルラットと類似しなかったため、第4章では、各種禁煙補助薬(バレニクリンを含む)の自殺の発現タイミングを算出することで、バレニクリン使用中に発現する自殺のリスク要因を探索した。各種禁煙補助薬の自殺発現タイミングから、自殺のリスク要因として、禁煙者の共通の背景であるニコチン退薬症候が疑われた。したがって、第5章では、ニコチン退薬症候モデルラットを作成し、同モデルラットの脳内メタボローム解析を実施することで、うつ病とニコチン退薬症候の類似性を調査した。以下得られた結果を5章に分け、バレニクリン使用中に発現するうつ病・自殺のリスク要因について記述する。

第1章 バレニクリン使用時の自殺発現リスクの実態調査と自殺予防効果の高い抗うつ薬の探索

第1節 緒言

喫煙は肺がんや慢性閉塞性肺疾患(COPD)、高血圧、虚血性心疾患、心血管疾患のような様々な疾患のリスク因子であり、World Health Organization (WHO)によれば、年間 600 万人以上が喫煙により死亡している[23]。喫煙による医療経済的および社会経済的損失は、日本では、それぞれ 1.8 兆円および 2.4 兆円であり、米国においては、1700 億ドルおよび 1560 億ドルにまで至り、極めて大きいことが報告されている[24,25]。したがって、禁煙治療の実施は続発疾患予防の点で費用対効果が高いことから、医療費の削減として禁煙が推奨されている[26]。

禁煙治療の 1 つに薬物補助療法が挙げられる。薬物補助療法で使用される禁煙補助薬として、ニコチン製剤を利用したニコチン代替療法のほか、 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体の部分作動薬であるバレニクリン(チャンピックス[®])や、ノルエピネフリン・ドパミン再取り込み阻害薬であるブプロピオン(Zyban[®])が臨床的に使用されている。とりわけ、バレニクリンは他の禁煙補助薬と比較し、禁煙成功率が高いことが知られていることから[7,27]、禁煙を推進するための重要な薬物である。

しかしながら、バレニクリンとうつ病等の精神疾患の悪化や自殺との関連が疑われたことから、2009 年、FDA はバレニクリンの label に最上位の警告である枠組み警告(boxed warning)を追記した[8]。これに倣い、本邦においても、「基礎疾患として有している精神疾患の悪化を伴うことがある」と添付文書の警告

欄に記載が追加されている。更には、FDA の有害事象自発報告システム (FAERS) の日本語検索システムである CzeekV (version 3.1.19) によれば、バレニクリンの使用による自殺念慮および自殺行為発現リスクは全薬物の中で第 1 位である。一方で、ランダム化比較試験を対象としたメタアナリシスでは、バレニクリンとうつ病もしくは自殺との関連はないと結論づけている[28]。すなわち、バレニクリン自体がうつ病や自殺を誘発する作用を持つかは明らかになっておらず、禁煙そのものがうつ病や自殺を誘発している可能性[29]や、喫煙者が既にハイリスク状態である可能性[30]も要因として考えられる。

現在、うつ病治療の第一選択薬として、比較的副作用の少ない選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)やセロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬(SNRI)が臨床使用されている[31]。しかし、プラセボ対照試験において、これらの抗うつ薬の投与による自殺リスクの増加が認められたことから、FDA は 2003 年に全 SSRI に対して注意喚起をした。他方、一般論文においても、抗うつ薬使用による自殺に関連したイベント数の増加が複数報告されている[32-34]。一方で、欧米において抗うつ薬と自殺に関する警告が出された後、オランダでは抗うつ薬の処方率が減り、同時に自殺率が上昇した報告[35]や、抗うつ薬処方数と自殺死亡率との間に負の相関があるという報告[36]もある。また、抗うつ薬は重症で致死的な自殺を防ぐ一方で、うつ病の軽症例では自殺念慮や自傷等を増やすといわれている[37]。以上のことから、うつ病の重症度に応じて、抗うつ薬の作用が変化する可能性があるため、うつ病患者の状態に応じて抗うつ薬を選択することが推奨されている。

上述したように、禁煙は経済学的に重要な因子であるため、進めなければならない政策の 1 つである。しかしながら、禁煙治療中に併発するうつ病や自殺に関連する事象は、禁煙を進めていくうえで大きな障害となっている。禁煙治

療中に発現するうつ病に対する抗うつ薬は慎重に選択されるべきであり、自殺関連事象発現リスクの低い、より安全な抗うつ薬の選択が重要となる。そこで著者は、バレニクリンによる禁煙治療中に、どのような抗うつ薬を併用した時に、自殺関連事象発現リスクが低いのか、その現状を **CzeekV** を利用したビッグデータ解析により検討することとした(第2節)。また、添付文書に記載されているように、バレニクリンによる禁煙治療が自殺関連事象発現リスクを上げる潜在要因となり得るのか(第3節)、そして、バレニクリン使用症例と抗うつ薬使用症例の自殺関連事象発現リスクを比較することで、バレニクリン使用症例の自殺関連事象リスクがどれほど高いかを調査することとした(第4節)。

上記3つの目的を達成するための手順を以下に簡潔に示した(Figure 1)。まず、**CzeekV** からバレニクリン使用症例および抗うつ薬使用症例をダウンロードした。次に、ダウンロードした症例を性別によって階層化し、性別ごとに自殺関連事象報告症例(case)と非報告症例(control)に分けた。case と control の背景を揃える為に、傾向スコアによる、case 群と control 群の1対1マッチングを実施した。マッチングされた症例を用いて、男女別の自殺関連事象リスクの評価(Reporting Odds Ratio, ROR)、および、性別を統合したリスク評価(integrated Reporting Odds Ratio, iROR)を実施した。なお、本学位論文における自殺関連事象の定義は“実験の部 P84”に示した。

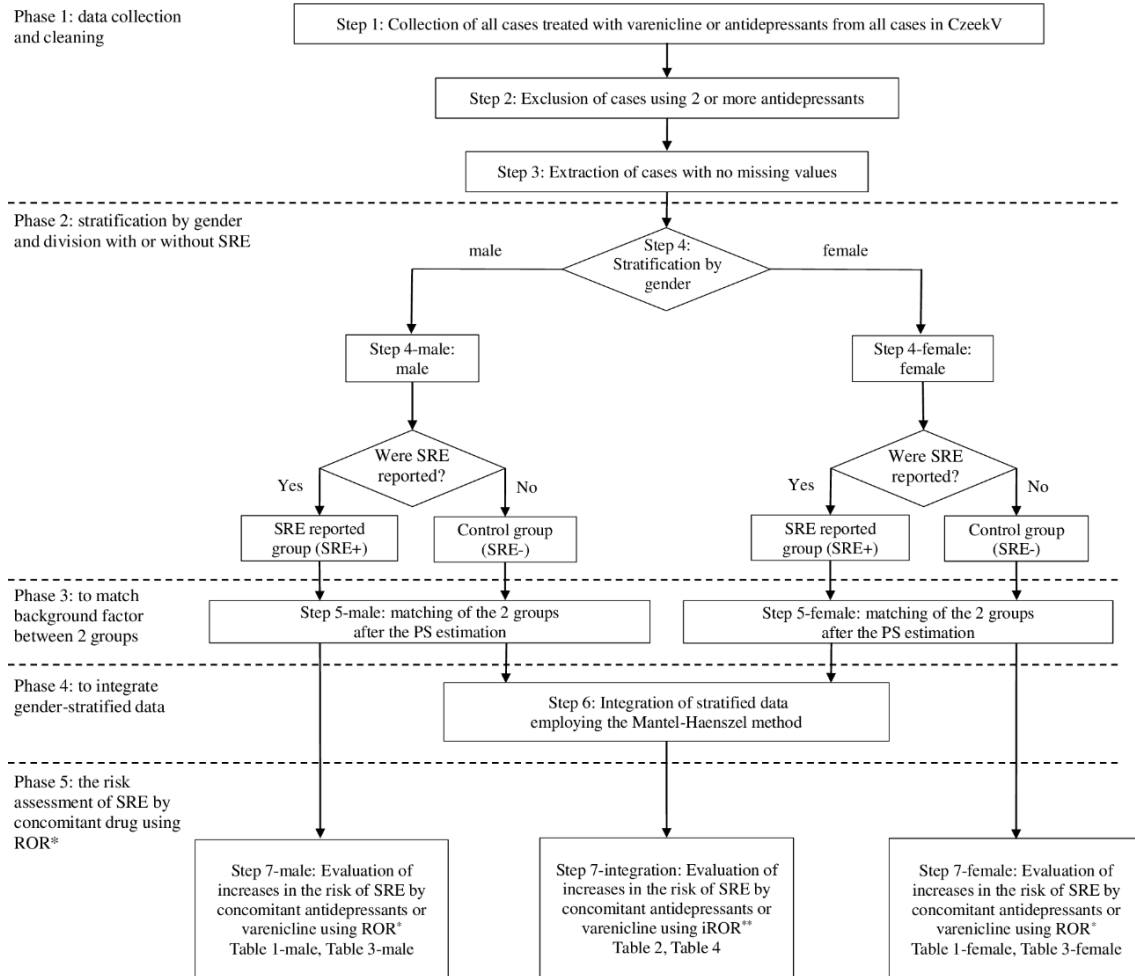


Figure 1. Flowchart for Reporting Odds Ratio calculations

SRE, suicide-related event; PS, propensity score; ROR, reporting odds ratio; iROR, integrated reporting odds ratio.

第2節 バレニクリン使用時における、 自殺予防効果の高い抗うつ薬の検出

本節では、バレニクリン使用症例において併用されていた抗うつ薬のうち、どの抗うつ薬の併用が最も自殺関連事象発現リスクを低下させるかについて調査した。

Table 1 には、バレニクリン使用時に併用された抗うつ薬の種類別自殺関連事象発現リスクを男女別に示した。男性では、バレニクリン使用中に何らかの抗うつ薬を併用した場合(All antidepressants in Table 1)、すなわち、バレニクリン使用中にうつ病が発症した場合、自殺関連事象発現リスクは 2.02 倍高くなった。抗うつ薬の種類別に見ると、ミルタザピンの併用では自殺関連事象発現リスクが最も高く(ROR = 7.33)、アミトリプチリンやパロキセチンの併用では最も自殺関連事象発現リスクが低かった(ROR = 1.05)。女性においては、バレニクリン使用中にうつ病が発症した場合、自殺関連事象発現リスクは 2.09 倍高くなった。抗うつ薬の種類別に見てみると、男性と同様、ミルタザピンの併用では自殺関連事象発現リスクが高く(ROR = 6.62)、アミトリプチリンやイミプラミンの併用では最も自殺関連事象発現リスクが低かった(それぞれ、ROR = 0.50, 0.00)。ただし、イミプラミンの併用症例は非常に少数であるため、正確なリスク評価はできていない。また、本解析では多重比較の問題があるため、有意水準($\alpha = 0.05$)に Bonferroni 補正をかけている。そのため、第二種の過誤(偽陰性)が生じやすくなっており、いずれの抗うつ薬においても ROR の統計的有意性は認められなかった。

Table 1. Influence of concomitantly administered antidepressants on the risk of suicide-related event in varenicline-treated cases

Table 1-male.

	Number of varenicline-treated cases				ROR	ROR 95%CI	<i>P</i> value
	with antidepressant		without antidepressant				
	SRE +	SRE -	SRE +	SRE -			
All antidepressants	58	30	601	629	2.02	1.28 – 3.19	0.002*
Mirtazapine	7	1	601	629	7.33	0.90 – 59.73	0.063
Citalopram	12	2	601	629	6.28	1.40 – 28.18	0.016
Bupropion	9	4	601	629	2.35	0.72 – 7.69	0.157
Duloxetine	6	3	601	629	2.09	0.52 – 8.41	0.299
Fluoxetine	5	3	601	629	1.74	0.42 – 7.33	0.450
Venlafaxine	5	3	601	629	1.74	0.42 – 7.33	0.450
Sertraline	9	6	601	629	1.57	0.56 – 4.44	0.395
Amitriptyline	2	2	601	629	1.05	0.15 – 7.45	0.961
Paroxetine	3	3	601	629	1.05	0.21 – 5.21	0.952

SRE, suicide-related event; ROR, reporting odds ratio; CI, confidence interval.

* significantly different after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

Significance level (Bonferroni's correction) = $0.05 / 10 = 0.005$.

Table 1-female.

	Number of varenicline treated cases				ROR	ROR 95%CI	P value
	with antidepressant		without antidepressant				
	SRE +	SRE -	SRE +	SRE -			
All antidepressants	163	86	746	823	2.09	1.58 - 2.76	< 0.001*
Mirtazapine	6	1	746	823	6.62	0.80 - 55.11	0.080
Sertraline	19	6	746	823	3.49	1.39 - 8.79	0.008
Duloxetine	21	7	746	823	3.31	1.40 - 7.83	0.006
Bupropion	15	6	746	823	2.76	1.06 - 7.15	0.037
Fluoxetine	27	14	746	823	2.13	1.11 - 4.09	0.023
Venlafaxine	25	13	746	823	2.12	1.08 - 4.18	0.030
Trazodone	6	4	746	823	1.65	0.47 - 5.89	0.439
Citalopram	12	13	746	823	1.02	0.46 - 2.25	0.961
Amitriptyline	5	11	746	823	0.50	0.17 - 1.45	0.201
Paroxetine	21	0	746	823	Inf	5.71 - Inf	-
Nortriptyline	3	0	746	823	Inf	0.45 - Inf	-
Amoxapine	1	0	746	823	Inf	0.03 -Inf	-
Clomipramine	1	0	746	823	Inf	0.03 -Inf	-
Trimipramine	1	0	746	823	Inf	0.03 -Inf	-
Lofepramine	1	0	746	823	Inf	0.03 -Inf	-
Imipramine	0	1	746	823	0.00	0.00 - Inf	-

Inf, infinite; SRE, suicide-related event; ROR, reporting odds ratio; CI, confidence interval. * significantly different after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

Significance level (Bonferroni's correction) = $0.05 / 10 = 0.005$.

Table 2 には、ROR の均質性検定(Breslow-Day test)の結果と、Mantel-Haenszel test により算出された統合 ROR (iROR)を示した。Breslow-Day test の結果、男女間で ROR の均質性が認められなかった抗うつ薬はシタロプラムのみであった (χ^2 -value = 5.01, $P = 0.025$)。それ以外の抗うつ薬の ROR は、男女間で均質性が認められたため、Mantel-Haenszel test を用いて ROR を統合し、iROR を算出した。

バレニクリン使用中にうつ病が発症した場合(All antidepressants in Table 2)、自殺関連事象発現リスクは 2.07 倍高くなった。抗うつ薬の種類別においては、性別を統合する前と同様、ミルタザピンの併用が最も自殺関連事象の発現リスクを高めた(iROR = 6.98)。一方、iROR が算出可能であった 8 種類の抗うつ薬の中で唯一、iROR が 1.0 未満であった抗うつ薬はアミトリプチリンであった (iROR = 0.59)。

Table 2. Uniformity test of ROR and calculation of iROR in varenicline-treated cases

	Breslow-Day Test (uniformity test)			Mantel-Haenszel Test (integration of sex)		
	χ^2 -value	df	P value	iROR	iROR95%CI	P value
All antidepressants	0.015	1.00	0.904	2.07	1.63 - 2.63	< 0.001*
Mirtazapine	0.004	1.00	0.947	6.98	1.57 - 30.99	0.007
Duloxetine	0.304	1.00	0.581	2.94	1.41 - 6.10	0.004*
Bupropion	0.042	1.00	0.838	2.59	1.24 - 5.45	0.015
Sertraline	1.296	1.00	0.255	2.52	1.26 - 5.02	0.009
Fluoxetine	0.061	1.00	0.805	2.06	1.14 - 3.73	0.022
Venlafaxine	0.059	1.00	0.809	2.05	1.11 - 3.78	0.028
Trazodone	0.194	1.00	0.660	1.39	0.51 - 3.76	0.518
Amitriptyline	0.427	1.00	0.513	0.59	0.23 - 1.50	0.360
Citalopram	5.010	1.00	0.025 ^a	#	#	-

df, degree of freedom; ROR, reporting odds ratio; iROR, integrated reporting odds ratio; CI, confidence interval. ^a non-uniformity. # Value could not be calculated due to the non-uniformity of ROR. * significantly different after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

第3節 バレニクリンとうつ病の増悪との関連性

本節では、バレニクリンの添付文書に記載されているように、バレニクリンは基礎疾患として有している精神疾患の悪化を伴うことがあるかについて調査した結果を示した。

Table 3 には、抗うつ薬によってうつ病を治療している症例をバレニクリン併用症例と併用していない症例に分け、バレニクリン併用時にどれほど自殺関連事象のリスクが上昇するか、すなわち、バレニクリンの併用がどれほど精神疾患であるうつ病を増悪させるか(自殺を誘発するか)に関するリスク評価の結果を示した。男性のうつ病治療症例では、使用している抗うつ薬の種類によらず、バレニクリンの併用により、自殺関連事象発現リスクが上昇、すなわち、基礎疾患として有しているうつ病の増悪が認められた(Table 3-male)。女性のうつ病治療症例においても、抗うつ薬の種類によらず、バレニクリンの併用によるうつ病の増悪が認められた(Table 3-female)。

Table 4 には、ROR の均質性検定(Breslow-Day test)の結果と、Mantel-Haenszel test により算出された iROR を示した。ミルタザピンおよびデュロキセチンは、男女とも症例数が 0 である項目があったため、Breslow-Day test を実施できず、iROR の算出もできなかった。それ以外の抗うつ薬に関しては、ROR の均質性が認められ、iROR を算出可能であった。男女の ROR を統合した結果、抗うつ薬の種類に関わらず、バレニクリンの併用により、基礎疾患として有しているうつ病の増悪が認められた。

Table 3. Influence of concomitantly administered varenicline on the risk of suicide-related event in antidepressant-treated cases

Table 3-male.

	Number of antidepressant treated cases				ROR	ROR 95%CI	<i>P</i> value
	with varenicline		without varenicline				
	SRE +	SRE -	SRE +	SRE -			
All antidepressants	56	9	1574	1621	6.37	3.14 - 12.90	< 0.001*
Bupropion	8	1	178	185	8.31	1.03 - 67.16	0.047
Venlafaxine	5	1	282	286	5.07	0.59 - 43.68	0.140
Sertraline	8	2	372	378	4.06	0.86 - 19.27	0.078
Fluoxetine	10	3	236	243	3.43	0.93 - 12.62	0.064
Trazodone	1	1	19	19	1.00	0.01 - 82.52	1.000
Mirtazapine	8	0	49	57	Inf	1.86 – Inf	-
Duloxetine	6	0	184	190	Inf	1.19 – Inf	-
Amitriptyline	1	0	80	81	Inf	0.03 – Inf	-

Table 3-female.

	Number of antidepressant treated cases				ROR	ROR 95%CI	<i>P</i> value
	with varenicline		without varenicline				
	SRE +	SRE -	SRE +	SRE -			
All antidepressants	174	21	2884	3037	8.23	5.53 - 13.76	< 0.001*
Sertraline	24	1	456	479	25.21	3.40 - 187.13	0.002*
Fluoxetine	32	4	364	392	8.62	3.02 - 24.60	< 0.001*
Venlafaxine	28	4	483	507	7.35	2.56 - 21.10	< 0.001*
Trazodone	6	1	52	57	6.58	0.77 - 56.47	0.086
Amitriptyline	5	1	86	90	5.23	0.60 - 45.71	0.135
Bupropion	15	5	216	226	3.14	1.12 - 8.79	0.029
Duloxetine	23	0	383	406	Inf	6.03 – Inf	-
Mirtazapine	6	0	60	66	Inf	1.23 – Inf	-

Inf, infinite; SRE, suicide-related event; ROR, reporting odds ratio; CI, confidence interval. * significantly different after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

Table 4. Uniformity test of ROR and calculation of iROR in antidepressant-treated cases

	Breslow-Day Test (uniformity test)			Mantel-Haenszel Test (integration of sex)		
	χ^2 -value	df	P value	iROR	iROR95%CI	P value
All antidepressants	0.520	1.00	0.471	8.02	5.47 - 11.76	< 0.001*
Sertraline	2.397	1.00	0.122	10.97	3.21 - 37.51	< 0.001*
Venlafaxine	0.093	1.00	0.761	6.88	2.67 - 17.74	< 0.001*
Fluoxetine	1.210	1.00	0.271	6.34	2.80 - 14.35	< 0.001*
Bupropion	0.708	1.00	0.400	4.02	1.60 - 10.12	0.002*
Trazodone	1.204	1.00	0.273	3.71	0.67 - 20.61	0.172
Amitriptyline	0.189	1.00	0.664	6.29	-	-
Mirtazapine	#	#	#	-	-	-
Duloxetine	#	#	#	-	-	-

df, degree of freedom; ROR, reporting odds ratio; iROR, integrated reporting odds ratio; CI, confidence interval. ^a non-uniformity. # Calculations were not possible because no case was reported. * significantly different after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

第 4 節 抗うつ薬使用症例と比較したバレニクリン 使用症例の自殺関連事象発現リスク

Figure 2A には、第 2 節および第 3 節において算出された、バレニクリンと抗うつ薬(All antidepressants)を併用した症例の iROR を示した。バレニクリン使用症例(ADs - / VAR + 症例)の自殺関連事象の発現リスクと、抗うつ薬使用症例(VAR - / ADs + 症例)の自殺関連事象の発現リスクは共に 1.00 である。しかしながら、ADs - / VAR + 症例と VAR - / ADs + 症例は疾患の背景が異なるため、両症例のリスクは直接比較できない(前者の背景は禁煙治療、後者の背景はうつ病治療)。第 3 節で算出された All antidepressants の iROR は 8.02 であり、第 2 節の iROR (= 2.07) よりも高いため、あたかも抗うつ薬へのバレニクリンの併用

(第3節)は、バレニクリンへの抗うつ薬の併用(第2節)よりも高いリスクを示すかのようであった。しかしながら、両者の使用薬物および背景疾患は同一であることから、これらの併用症例の自殺関連事象発現リスクは同等であると考えられる。そこで、これら併用症例は同一母集団からサンプリングされたと仮定し、両症例の iROR を 1.00 に基準化することで、ADs - / VAR +症例と VAR - / ADs + 症例の iROR を比較した。

Figure 2B には、バレニクリンと抗うつ薬の両方を併用していた症例の自殺関連事象発現リスクを 1.00 に基準化した時の ADs- / VAR+症例と VAR- / ADs+症例の iROR をそれぞれ示した。併用症例のリスクを 1.00 に基準化することにより、バレニクリン使用症例のリスクは、抗うつ薬使用症例のリスクと比較し、4 倍 ($0.48 / 0.12 = 4$) 高くなることがわかった。

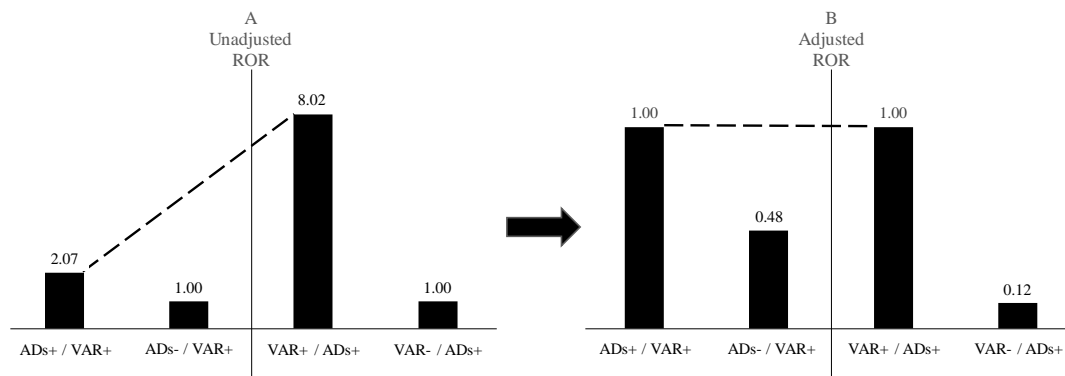


Figure 2. Unadjusted iROR (A) and adjusted iROR (B) of varenicline and antidepressants determined by matching in each study

ROR, reporting odds ratio; ADs, antidepressants; VAR, varenicline.

第5節 考察と小括

バレニクリン使用中にうつ病が発症し、何らかの抗うつ薬が併用された場合、抗うつ薬を併用しない場合と比べて、自殺関連事象発現リスクが高まることが示唆された。しかしながら、抗うつ薬を種類ごとに分けた場合、ミルタザピンの併用が最もリスクが高い一方で、アミトリプチリンの併用が最もリスクが低かった。Coupland らは、抗うつ薬の使用による自殺既遂のハザード比はアミトリプチリンのみ有意に低いことを報告しており[38]、本解析ではこれを支持する結果が得られた。したがって、バレニクリン使用中に発現するうつ病に対して使用される抗うつ薬は種類ごとに自殺リスクが異なり、アミトリプチリンの併用がより安全であることが示唆された。

バレニクリン使用症例と抗うつ薬使用症例の背景はそれぞれ異なる。そのため、両者の自殺関連事象発現リスクを直接比較することはできなかった。しかしながら、バレニクリンと抗うつ薬の併用症例の自殺関連事象発現リスクを“1”として基準化することにより、バレニクリン使用症例では、抗うつ薬使用症例と比較し、リスクが4倍高いことが明らかとなった。うつ病患者に対し、抗うつ薬を使用した場合としない場合とでは、使用した方が自殺リスクは低いことが知られている。しかしながら、うつ病患者では、たとえ抗うつ薬を使用している、健常者に比べ、自殺リスクは有意に高いことも知られている[39]。したがって、本解析結果から、抗うつ薬を使用したうつ病患者(健常者と比較し有意に自殺リスクが高い)と比較し、バレニクリン使用者では、さらにリスクが4倍高いため、バレニクリン使用中のうつ病や自殺の発現には特に注意を要することが示唆された。しかしながら、本研究結果のみでは、バレニクリン使用症例の自殺関連事象のリスク要因を明らかにすることはできていない。

第2章 うつ病モデルラットの脳内メタボローム解析

第1節 緒言

うつ病の罹患者数が3億人に達していることが World Health Organization により公表されている[1]。うつ病は、不眠、体重の減少、疲労感、集中力の低下のような、様々な症状を呈し、抑うつ状態や無快楽状態 (“anhedonia”)は、うつ病の中核症状として位置付けられている[40]。犯罪被害や経済的な問題、離婚のような stressful life events への曝露がうつ病のリスクファクターの1つであるとされている[41]。しかしながら、stressful life event を経験した人すべてがうつ病を発症するわけではなく、ストレスに適応することでうつ病が発症しない人もいる。ストレスに曝露しても、それに上手く適応するための能力は resilience と称され[42]、resilience を獲得している人はストレスに対する能動的対処 (active coping)を持つとされている[43]。

疾患モデル動物を作成することは、疾患のメカニズムや、新薬の研究開発に関する知見を得るために重要である。うつ病モデルラットの中でも、慢性ストレスモデル(chronic mild stress model, CMS モデル)ラットは、構成概念妥当性、表面妥当性、予測妥当性が良いとされており[44]、慢性的なストレスの負荷は、anhedonia を引き起こすことが知られている[45]。しかしながら、CMS モデルラットの作成には数週間を必要とするだけでなく、再現性が低いことも知られている[46]。CMS モデルの再現性が低い理由は、慢性的にストレスを負荷されたラットすべてが anhedonia を呈するわけではないためであると考えられる[47]。慢性的にストレスを負荷されても anhedonia を呈さないラットは resilient ラット、anhedonia

を呈するラットは **susceptible** ラットと称され、これらのラットは **stress resilience** の研究に利用されている[48,49]。ラットがストレスに対して **low-response** であるか **high-response** であるかは、その行動に反映されるため、抗うつ薬の効果は行動試験により評価されている [50]。以上のことから、うつ病モデルラットを作成する際には、個々のラットの行動を可能な限り揃える必要がある。

いくつかの研究によれば、海馬は記憶や認知機能だけでなく、気分調節にも関与しているとされている[51-53]。さらに、海馬の構造や機能はストレスへの感受性が高いことが報告されている [54,55]。慢性的なストレスの負荷は、海馬において、**neurons survival** や **synaptic plasticity** に関わる **brain-derived neurotrophic factor (BDNF)**を減少させることが知られている[56]。また、BDNF の海馬内投与が抗うつ作用を示すことや[57]、いくつかの抗うつ薬の効果に **BDNF** が必要であることも報告されている[58]。基礎的研究では、海馬の **BDNF** 濃度が、化合物の抗うつ作用のマーカーとして利用されている [59,60]。

メタボローム解析とは、生体内低分子代謝物を包括的に解析すること、すなわち、生体のゲノム情報の実行結果を解析することである。メタボローム解析の対象となる代謝物は、基幹代謝物であるため、生物間で互換性を有する[18]。Figure 3 に示したように、メタボローム解析は、ゲノム解析やプロテオーム解析よりも下流に位置していることから、表現型(**phenotype**)を反映しやすいオーム解析である。そこで著者は、生体試料を非侵襲的に計測可能である、**High Resolution-Magic Angle Spinning (HR-MAS) ¹H NMR spectroscopy** を用いたメタボローム解析を利用し、うつ病様状態のラット海馬の代謝物プロファイルを評価することとした [61,62]。

上記のことから、第 2 章では、**anhedonia** の評価指標である **sucrose preference** に基づいて、**CMS** モデルラットを **resilient** ラットと **susceptible** ラットに分類し

(第2節)、海馬組織のメタボローム解析を実施することにより、これらラットの脳内代謝物プロファイルの違い(第3節)、および、resilient と susceptible を区別可能なバイオマーカー(第4節)について調査することで、stress susceptibility (あるいは stress resilience)が脳内メタボロームに反映されるかを解析した。

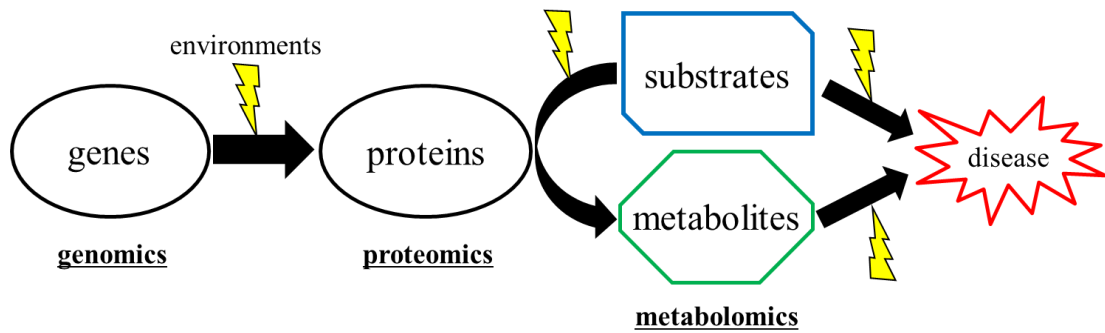


Figure 3. The position of metabolomics in -omics

第2節 ストレスが及ぼすラットの行動および 海馬 BDNF への影響

本節では、慢性的なストレス負荷による CMS モデルラットの作成、および、sucrose preference に基づいた resilient ラットと susceptible ラットの選別、さらには、これらラットの海馬における BDNF の変動に関して記載した。

ストレス負荷前のラットの中には、あたかもストレス負荷後のような行動を示すラット(例えば、sucrose preference が実験開始前から既に低いラット)があり、そのようなラットはストレス負荷に対して異なるレスポンスを示す可能性があることから[63]、まず、ストレス負荷前の時点(pre-experiment)で、ストレスを負荷するラット(stress group)と負荷しないラット(control group)の行動が等しくなるように、異常な行動(sucrose preference < 80.0%)を示したラットを実験から除外した。除外されなかったラットは、stress group では 21 匹中 18 匹、control group では 18 匹中 14 匹であった。ストレスを負荷されたラットがうつ病様状態になったかを確認するために、sucrose preference test に加え、body weight の測定および自発行動や不安を評価できる open field test (crossing, rearing, defecation, and grooming)を実施した(全 6 項目, P 88 参照)。

Pre-experiment と 4 週間のストレス負荷後の行動評価の結果を Figure 4 に示した。Two-tailed student's *t*-test を実施した結果、Pre-experiment では、6 つの評価項目すべてにおいて、control group と stress group 間で有意な違いは認められず、2 群の行動が等しいことを確認できた(Figure 4A-4F)。

慢性ストレスが body weight や sucrose preference に影響を与えているかを調べるために、two-way repeated measures ANOVA を実施した。その結果、慢性ストレ

ス [$F_{(1,120)} = 3668.5, P < 0.01$] やストレス負荷期間 [$F_{(4,120)} = 634.08, P < 0.01$] が有意に body weight に影響を与えていることがわかった。さらには、慢性ストレスとストレス負荷期間との間に統計学的交互作用が認められた [$F_{(4,120)} = 303.64, P < 0.01$]。Sucrose preference についても同様に、慢性ストレス [$F_{(1,120)} = 12.446, P < 0.01$] やストレス負荷期間 [$F_{(4,120)} = 7.171, P < 0.01$] が有意に影響を与えており、2 要因間に統計学的交互作用が認められた [$F_{(4,120)} = 6.013, P < 0.01$]。Body weight はストレス負荷開始直後 (Day 7) から有意に減少しているのに対し ($P < 0.01$; Figure 4B)、うつ病の中核症状である anhedonia の指標とされている sucrose preference は、ストレス負荷を開始してから 4 週間後 (Day 29) に有意に低下した ($P < 0.05$; Figure 4A)。

Locomotor activity の指標である crossing (自発行動) と rearing (好奇心) は慢性ストレスの負荷により有意に減少した (それぞれ $P < 0.01, P < 0.05$; Day 30 in Figure 4C, D)。不安の指標である defecation は上昇傾向を示し ($P = 0.064$; Figure 4E)、不安のもう 1 つの指標である grooming については有意な増加が認められた ($P < 0.01$; Figure 4F)。以上のことから、慢性的なストレス負荷により、CMS モデルラットが作成された。

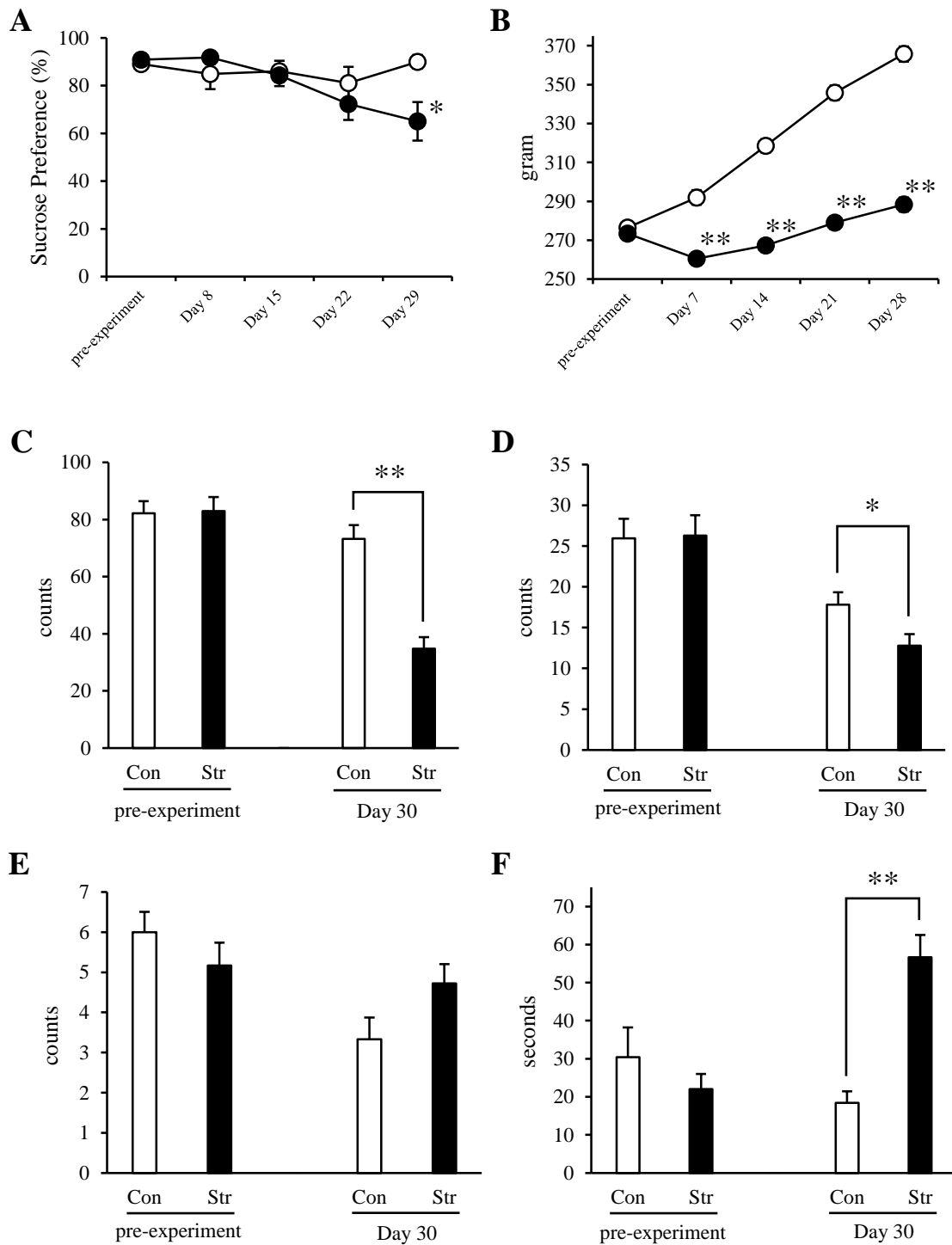


Figure 4. Influence of stress load on rats' behaviors and actions

Following two-way repeated measures ANOVA on sucrose preference (A) and body weight (B), the two-tailed student's *t*-test was performed for each time point. Regarding crossing (C), rearing (D), defecation (E), and grooming (F), the two-tailed student's *t*-test was performed for the pre-experiment period and Day 30. All data are presented as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. Con: Control Group ($n = 14$); Str: Stressed Group ($n = 18$).

Pre-experiment から 1 週間おきに測定した sucrose preference の分布を Figure 5 に示した。

White circle で示された、control group の各ラットの sucrose preference は、一部のラットにおいては減少が認められたものの、大部分のラットにおいては 4 週間に亘りほとんど変化しなかった。グレーもしくは黒の丸印で示された stress group は、pre-experiment の時点では、80.0%から 100.0%の間に分布していた。しかしながら、ストレス負荷に応じて、stress group のラットは、経時的に sucrose preference が低下するラット(black circle)と、全く低下しないラット(gray circle)に明確に分かれた。

本研究では、既報の文献に従い[49]、stress group (n = 18, gray and black circle, Figure 5)のラットのうち、Day 29 における sucrose preference が 65.0%未満であったラットを susceptible group (n = 8, black circle)に、残りの stress group のラットのうち、sucrose preference の変化が 10%未満であったラットを resilient group (n = 9, gray circle)に分類した。なお、stress group の中の 1 匹のラット(black box)は、pre-experiment における sucrose preference は 89.7%であり、Day 29 の時点では 74.0%であった(Figure 5; excluded)。このラットは、sucrose preference の変化が 15.7%であったこと、および、Day 29 における sucrose preference が 65.0%以上であったことから、resilient group にも susceptible group にも属さない。そのため、このラットは以降の実験から除外した。

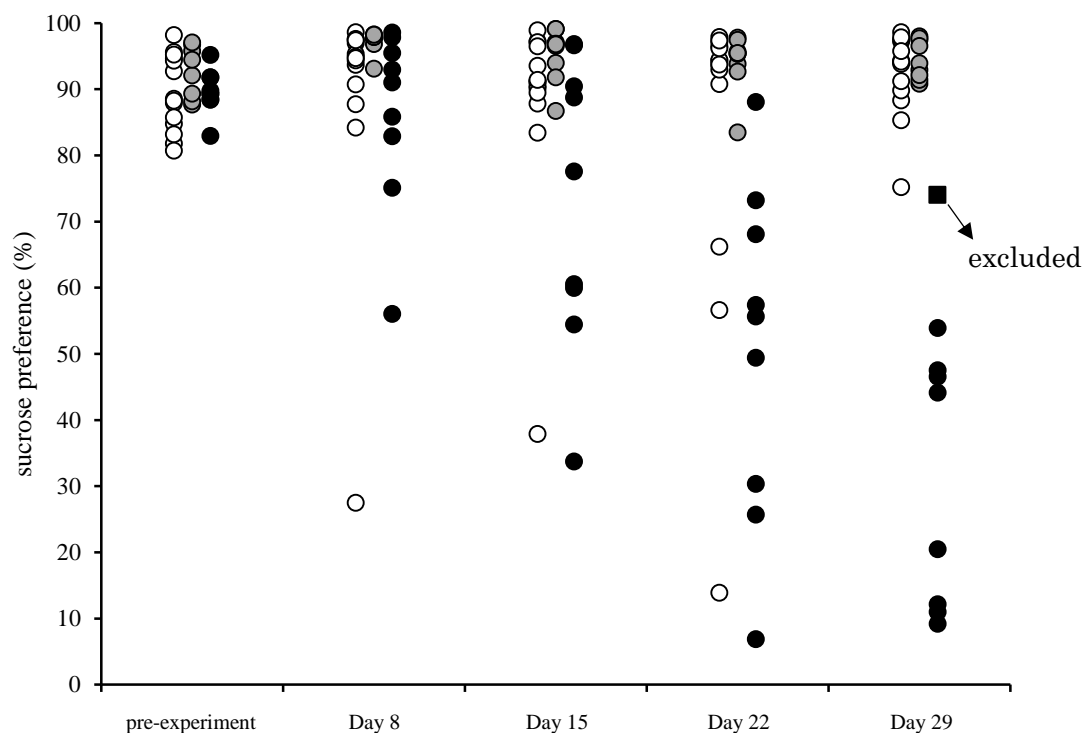


Figure 5. Timeline changes in the sucrose preference of individual rats

The white circle indicates Control rats, and either grey or black circles indicate rats in the Stressed Group. The grey and black circles represent resilient rats and susceptible rats, respectively. One rat in the Stressed Group whose sucrose preference was 74.0% on Day 29 was excluded from the experiments.

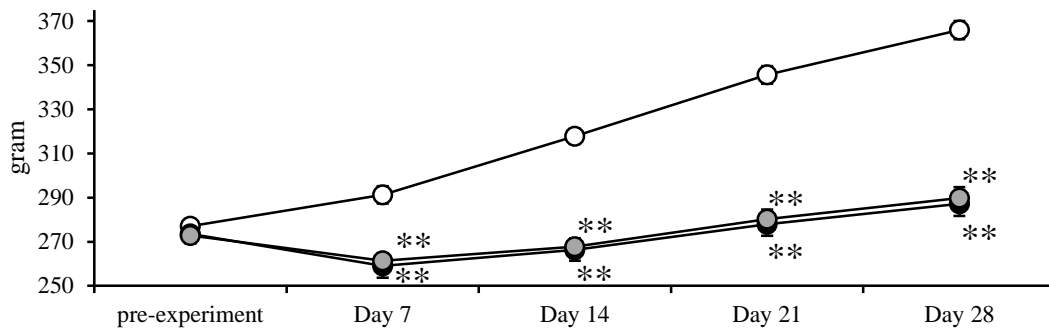
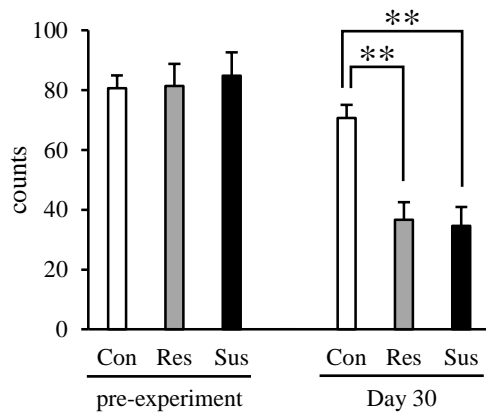
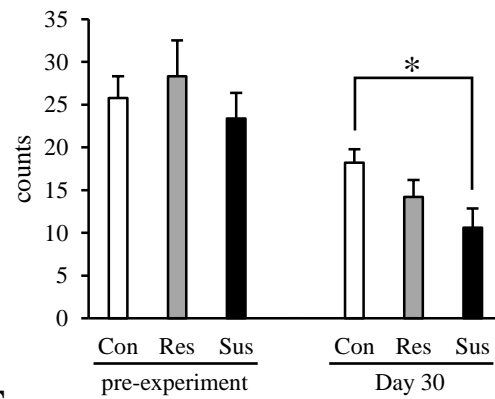
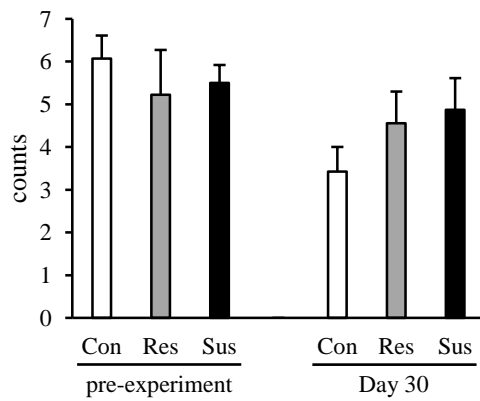
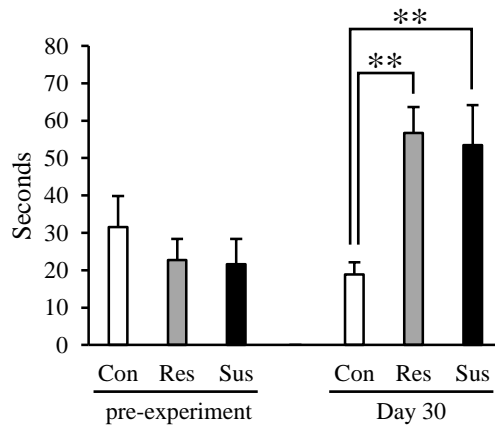
Stress group を resilient group と susceptible group に分けた後、control, resilient, susceptible group の 3 群での行動評価の結果の比較を Figure 6 に示す。

Two-way repeated measures ANOVA を body weight について実施したところ (Figure 6A)、body weight は群間要因 [$F_{(2,112)} = 1737.33, P < 0.01$] とストレス負荷期間 [$F_{(4,112)} = 622.91, P < 0.01$] の影響を有意に受けており、これら 2 要因間で統計学的交互作用が認められた [$F_{(8,112)} = 141.68, P < 0.01$]。

One-way ANOVA を実施した結果、Pre-experiment において、control, resilient, susceptible group の 3 群の crossing [$F_{(2,28)} = 0.12, P = 0.89$], rearing [$F_{(2,28)} = 0.50, P = 0.61$], defecation [$F_{(2,28)} = 0.42, P = 0.66$], grooming [$F_{(2,28)} = 0.56, P = 0.58$] は、いずれの項目においても有意な違いは認められなかった (Figure 6A-6E)。しかしながら、4 週間のストレス負荷終了後、crossing [$F_{(2,28)} = 16.16, P < 0.01$], rearing [$F_{(2,28)} = 4.21, P < 0.05$], grooming [$F_{(2,28)} = 12.09, P < 0.01$] は 3 群間で有意に異なっている。

た。一方で、rearing に関しては3群間に有意な差は認められなかった [$F_{(2,28)} = 1.39$, $P = 0.27$]。

次に、4週間のストレス負荷終了後の crossing, rearing, defecation, grooming について、Tukey-Kramer method を用いた多重比較を実施した。その結果、resilient group と susceptible group の crossing は、control group と比較し有意に減少した(それぞれ、test statistic = 4.67, $P < 0.01$ and test statistic = 4.77, $P < 0.01$ in Figure 6B)。Rearing に関しては、susceptible group は control group と比較し有意に減少した (test statistic = 2.85, $P < 0.05$ in Figure 6C)。Defecation は3群間で有意な違いは認められなかった (Figure 6D)。Resilient group と susceptible group の grooming は control group と比較し有意に増加した(それぞれ、test statistic = 4.32, $P < 0.01$ and test statistic = 3.81, $P < 0.01$ in Figure 6E)。

A**B****C****D****E****Figure 6. Changes in behaviors related to sensitivity to stress**

White circles represent the Control Group, grey circles represent the Resilient Group, and black circles represent the Susceptible Group. Following two-way repeated measures ANOVA on body weight (A), a multiple comparison was conducted for each time point using Tukey-Kramer method. Regarding crossing (B), rearing (C), defecation (D), and grooming (E), one-way ANOVA was performed for the pre-experiment period and Day 30, followed by a multiple comparison using Tukey-Kramer method. All data are presented as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$ compared to the Control Group, **: $P < 0.01$ compared to the Control Group. Con: Control Group (n = 14); Res: Resilient Group (n = 9); Sus: Susceptible Group (n = 8).

各群の海馬 mature BDNF 量を Figure 7 に示した。Control group と stress group の海馬組織中の mature BDNF 量はそれぞれ、 4507.6 ± 123.0 pg/mg protein (mean \pm SEM) と 4722.9 ± 124.0 pg/mg protein であり、2 群間で有意な差は認められなかった [$t_{(29)} = -1.22, P = 0.23$; Figure 7A]。stress group を resilient group と susceptible group に分け、one-way ANOVA を実施しても有意な差は認められず、Tukey-Kramer method を用いた多重比較を実施しても 3 群間で有意な違いは検出できなかった (control = 4507.6 ± 123.0 pg/mg protein, resilient = 4725.6 ± 200.8 pg/mg protein, susceptible = 4719.9 ± 151.4 pg/mg protein; Figure 7B)。

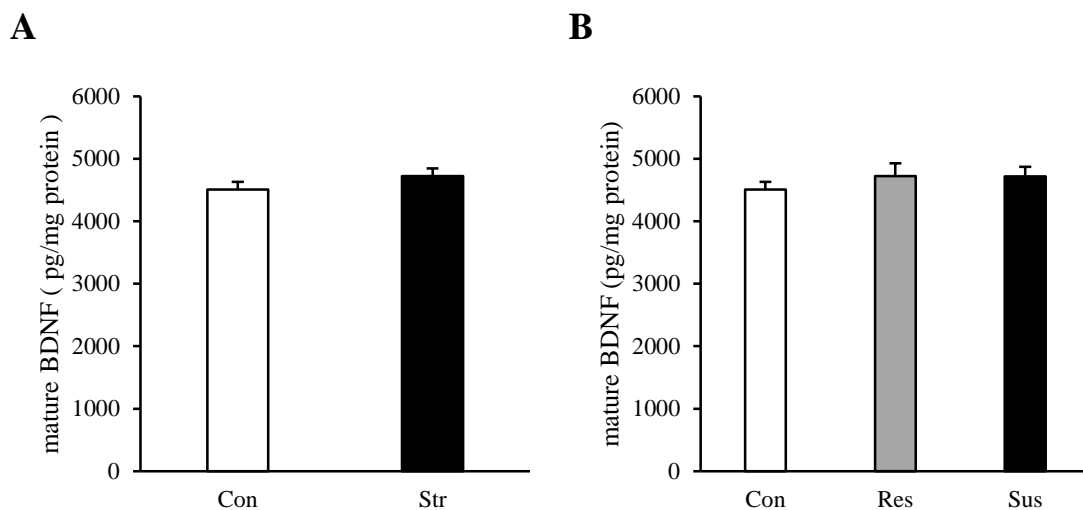


Figure 7. Comparison of the amount of mature BDNF in the hippocampal tissue

Two-tailed student's *t*-test was conducted to compare two groups (A). For comparison among 3 groups (B), one-way ANOVA was performed followed by a multiple comparison using Tukey-Kramer method. All data are presented as mean \pm SEM. Con: Control Group (n = 14); Str: Stressed Group (n = 18); Res: Resilient Group (n = 9); Sus: Susceptible Group (n = 8); BDNF: brain-derived neurotrophic factor.

第3節 resilient ラットおよび susceptible ラットの 脳内代謝物プロファイル

Figure 8 には、control group と stress group の脳内代謝物プロファイルと、validity plot (permutation plot)を示した。NMR スペクトルのバケット積分値に対し partial least square discriminant analysis (PLS-DA)を実施したところ、control group (white circle)と stress group (black circle)の脳内代謝物プロファイルは判別可能であった。しかしながら、2 群は明確に判別できるわけではなく、一部のラットのプロファイルは、もう一方の群のプロファイルに紛れていた(Figure 8A)。control group と stress group の PLS-DA モデルの適合性と予測性を表す R^2Y cum value と Q^2 cum value はそれぞれ、0.679 と 0.401 であった。一番右のオリジナルの値(R^2Y cum = 0.679, Q^2 cum = 0.401)と比較し、左側のすべての R^2Y value (blue, 適合性)および Q^2 value (green, 予測性)は低かった(Figure 8B) [64]。そのため、control group と stress group の PLS-DA モデルの妥当性は良いことがわかった。しかしながら、PLS-DA モデルの予測性は低かった[65]。

Control group と susceptible group の脳内代謝物プロファイルと permutation plot を Figure 9A と 9B にそれぞれ示した。Figure 9A より、control group と susceptible group の脳内代謝物プロファイルは明確に判別可能であった。さらに、 R^2Y cum は 0.866、 Q^2 cum は 0.659 であり (Figure 9B)、control group と stress group の PLS-DA モデルよりも、適合性と予測性は高かった。

次に、Control group と resilient group の脳内代謝物プロファイルと permutation plot を Figure 9C と 9D にそれぞれ示した。Figure 9C より、control group と resilient group の脳内代謝物プロファイルは明確に判別できず、一部のラットのプロファ

イルは、もう一方の group のプロファイルに紛れていた。Permutation plot (Figure 9D)より、 R^2Y cum は 0.577、 Q^2 cum は 0.243 であり、control group と stress group の R^2Y cum および Q^2 cum はそれぞれ、0.679 と 0.401 であったことから、control group と resilient group の PLS-DA モデルの適合性と予測性は低いことがわかった。

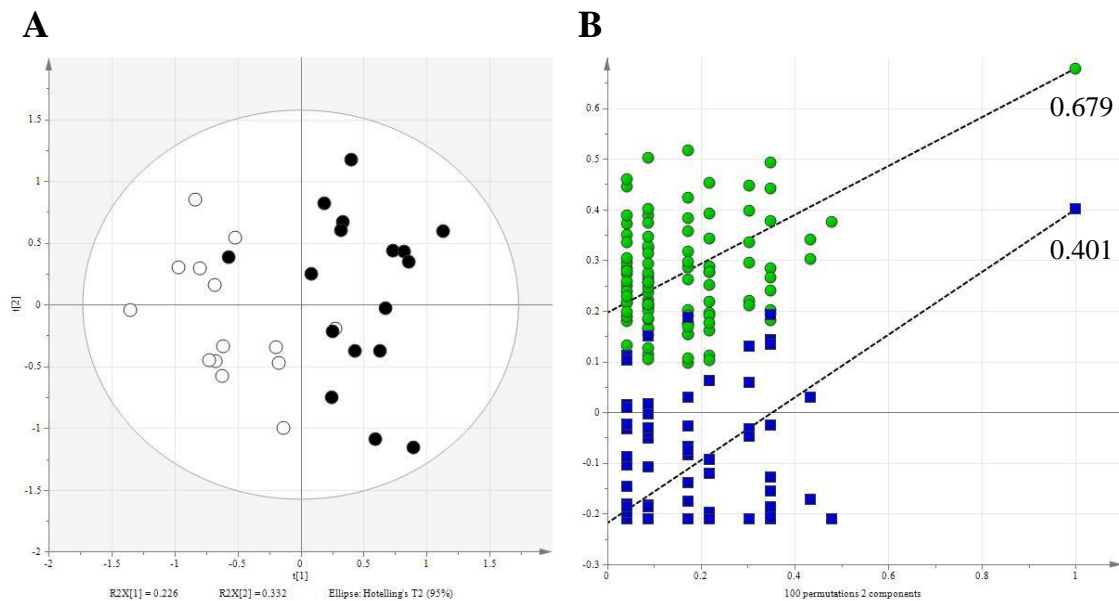


Figure 8. Influence of stress loading on brain metabolite profiles

(A) Partial least squares discriminant analysis score plot: White circles represent the Control Group and black circles represent the Stressed Group. (B) Permutation plot with 100 iterations: Green circles represent fitness (R^2Y cum = 0.679) and blue boxes represent predictability (Q^2 cum = 0.401).

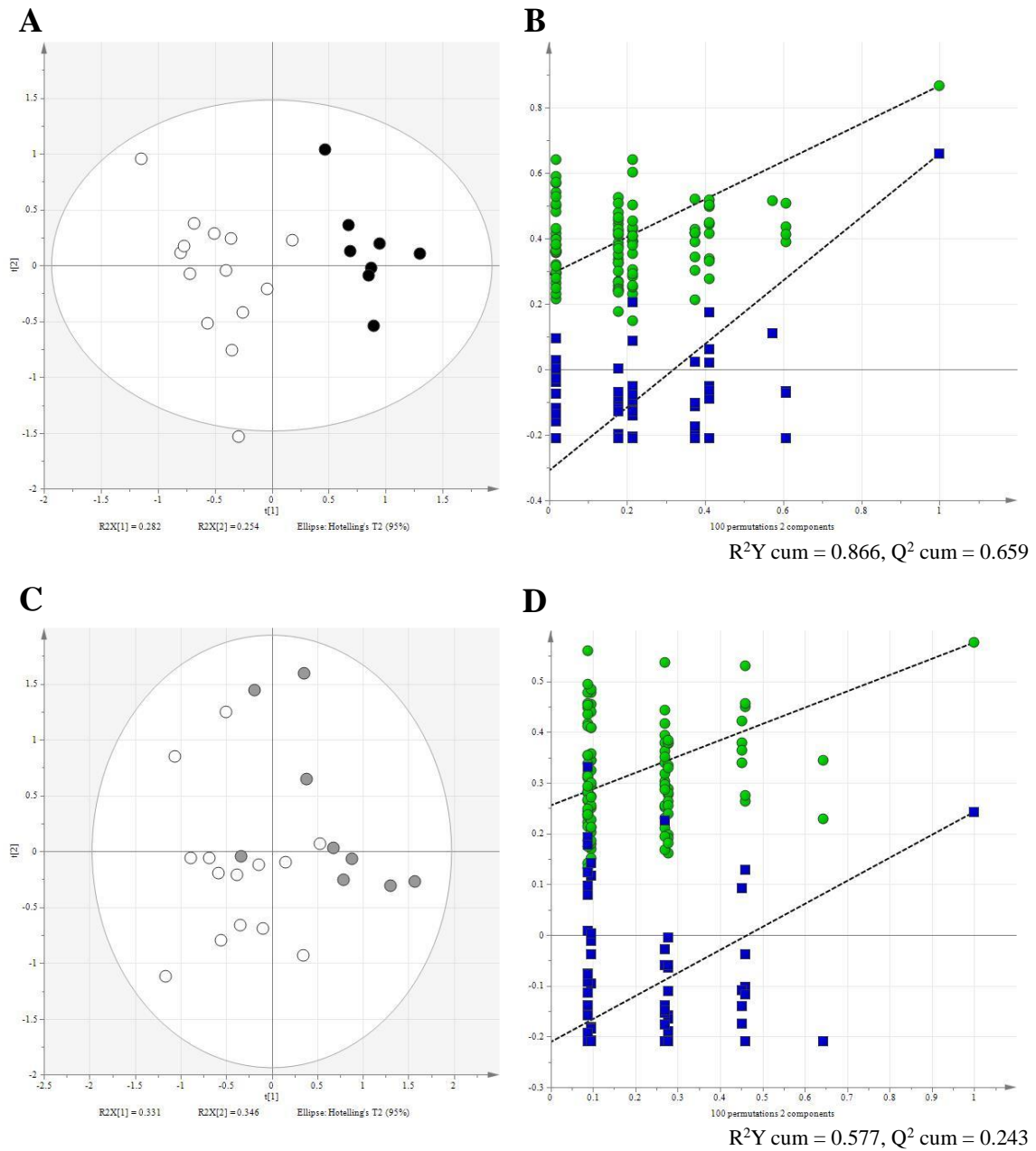


Figure 9. Changes in brain metabolite profiles in relation to sensitivity to stress

(A) Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plot: The white circles represent the Control Group and the black circles represent the Susceptible Group. (B) Corresponding permutation plot with 100 iterations: Green circles represent fitness (R^2Y cum = 0.866) and blue boxes represent predictability (Q^2 cum = 0.659). (C) PLS-DA score plot: White circles represent the Control Group and the grey circles represent the Resilient Group. (D) Corresponding permutation plot with 100 iterations: The green circles represent fitness (R^2Y cum = 0.577) and the blue boxes represent predictability (Q^2 cum = 0.243).

第 4 節 海馬組織における各脳内代謝物の変動

本節では、慢性的にストレスを負荷されたラット海馬における各脳内代謝物の変動と、resilient ラットおよび susceptible ラットを区別可能なバイオマーカーとなる候補代謝物について示した。

ラット海馬の NMR スペクトルから、12 種類の脳内代謝物を割り当てることが可能であった(Figure 10)。本節では、割り当てられた 12 種類の代謝物のうち、two-tailed student's *t*-test により算出された *P* value が <0.05 であり、かつ、variable importance in projection (VIP) スコアの 95%信頼区間(CI)下限値が >1.0 であった脳内代謝物をバイオマーカーの候補分子とみなした[66]。

Table 5 には、stress group における脳内代謝物の変動を、control group に対する相対値として示した。Stress group で有意に増加していた代謝物は、N-アセチルアスパラギン酸 ($P < 0.01$)とグルタミン酸 ($P = 0.04$)の 2 種類であり、有意に減少していた代謝物は、 γ -アミノ酪酸(GABA; $P < 0.01$)と酢酸 ($P < 0.01$)、アスパラギン酸 ($P < 0.01$)の 3 種類であった。これら 5 種類の代謝物のうち、VIP スコアの 95%CI 下限値が >1.0 であった代謝物は、N-アセチルアスパラギン酸、GABA、酢酸、アスパラギン酸であった。したがって、本研究では、この 4 種類の代謝物が、control group と stress group を判別できるバイオマーカー候補代謝物として検出された。

Figure 11 には、control, resilient, susceptible の 3 群間での、12 種類の脳内代謝物の変動を示した。各脳内代謝物について one-way ANOVA を実施した結果、N-アセチルアスパラギン酸 [$F_{(2,30)} = 46.80, P < 0.01$]、アスパラギン酸 [$F_{(2,30)} = 32.11, P < 0.01$]、GABA [$F_{(2,30)} = 12.84, P < 0.01$]、グルタミン酸 [$F_{(2,30)} = 3.96, P < 0.05$]、酢酸 [$F_{(2,30)} = 16.63, P < 0.01$]の 5 種類の脳内代謝物で有意性が認められた。次に、

これら 5 種類の代謝物について、Tukey-Kramer method を用いた多重比較を実施した。その結果、N-アセチルアスパラギン酸のみがストレスの負荷により増加しただけでなく、resilient group と susceptible group 間で有意に異なっていた (すべての対比較について、 $P < 0.01$)。その他の 4 種類の代謝物に関しては、resilient group と susceptible group 間で統計学的有意性は認められなかった。

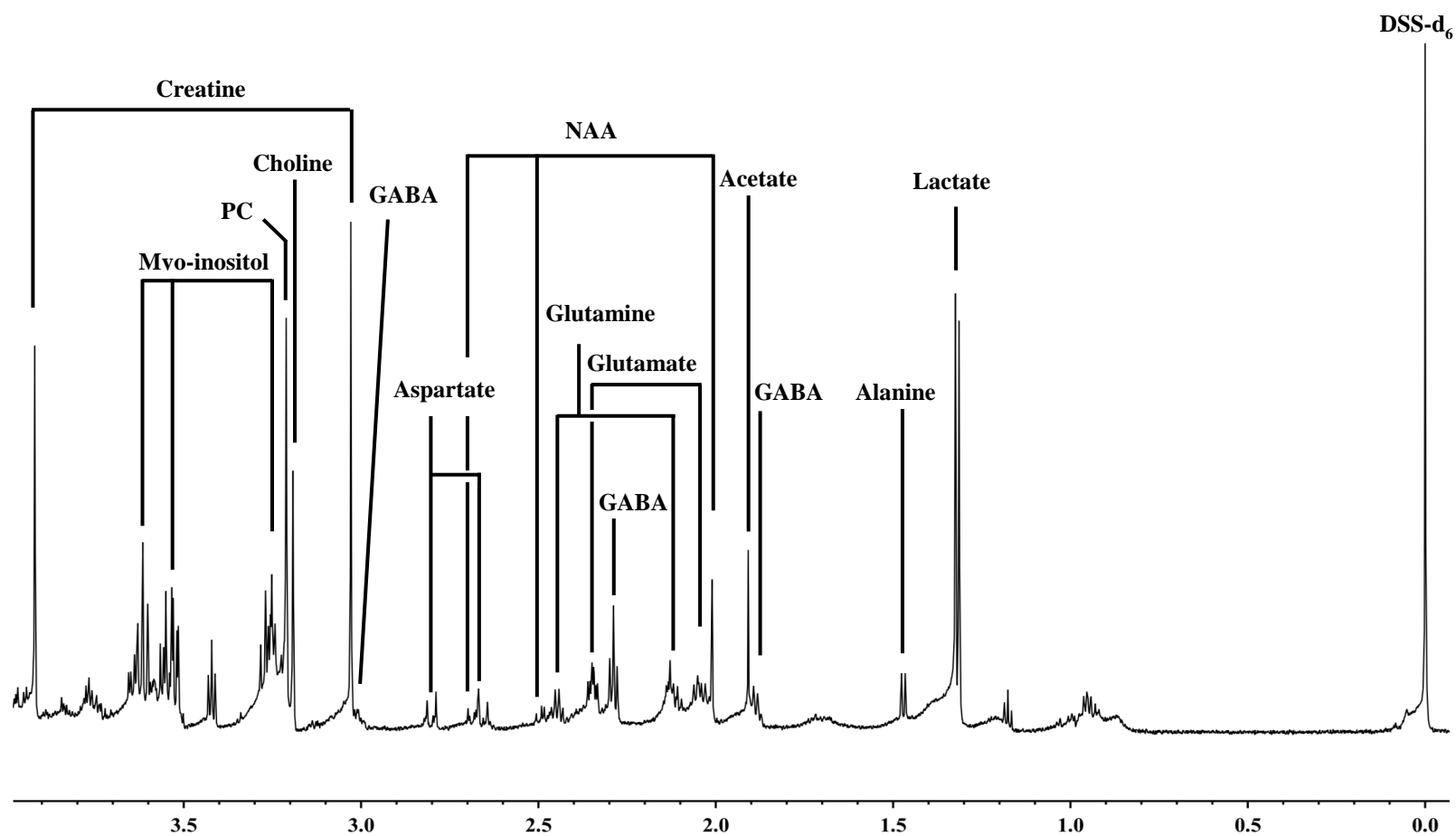


Figure 10. Representative example of raw HR-MAS ^1H NMR CPMG spectra (-0.05 – 4.00 ppm) from rat hippocampal tissue.

CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill; NAA, N-acetylaspartate, GABA, γ -aminobutyric acid; PC, phosphocholine.

Table 5. Relative changes in each brain metabolite

Metabolite	Chemical Shift (ppm)	Changed ^a (fold difference ^b)	<i>P</i> value	VIP score	VIP score 95%CI
N-acetylaspartate	2.01, 2.49, 2.68	↑ (1.26)	< 0.01	9.01	7.74 – 10.27
GABA	1.90, 2.29, 3.01	↓ (0.78)	< 0.01	7.64	5.09 – 10.18
Phosphocholine	3.21, 3.58, 4.16	(1.04)	0.17	5.81	-0.58 – 12.21
Acetate	1.91	↓ (0.86)	< 0.01	4.40	2.53 – 6.27
Aspartate	2.68, 2.80, 3.89	↓ (0.85)	< 0.01	2.50	1.69 – 3.31
Lactate	1.32, 4.10	(1.01)	0.72	1.36	-3.70 – 6.42
Glutamine	2.14, 2.43, 3.77	(0.96)	0.09	0.84	-0.30 – 1.97
Myo-inositol	3.27, 3.52, 3.61	(1.02)	0.39	0.67	-0.29 – 1.62
Alanine	1.47, 3.77	(0.93)	0.11	0.36	-0.94 – 1.66
Glutamate	2.04, 2.12, 2.33	↑ (1.07)	0.04	0.25	-0.04 – 0.54
Choline	3.19, 3.51, 4.05	(1.02)	0.69	0.22	-0.06 – 0.49
Creatine	3.03, 3.92	(1.00)	0.99	0.05	-0.65 – 0.76

^a Arrows represent an increase or decrease of the metabolite compared to the control group. ^b Fold differences were calculated by ratios of the mean of the integral value of each bucket and are shown in parentheses. GABA, γ -aminobutyric acid; VIP, variable importance in projection; CI, confidence interval.

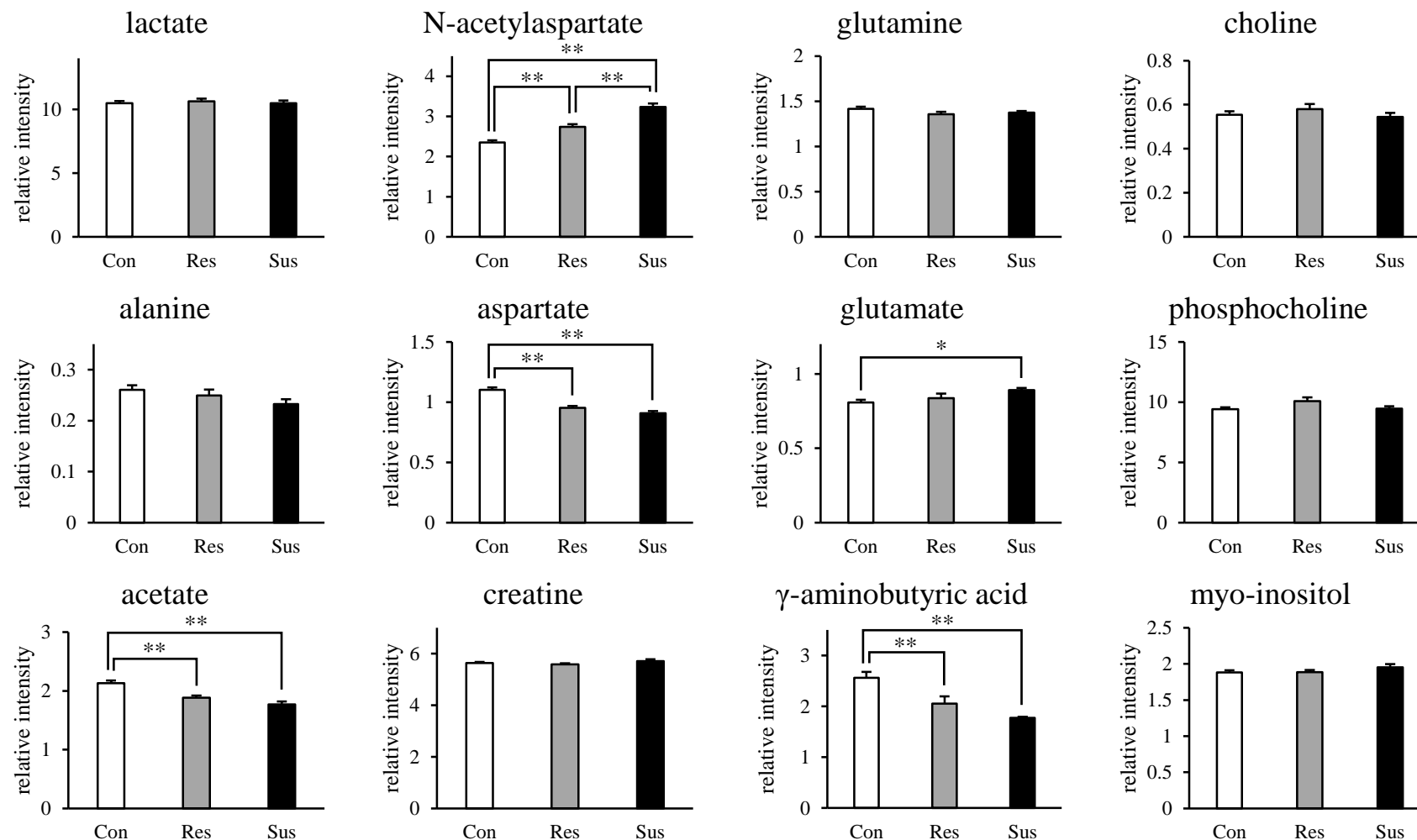


Figure 11. Relative changes in brain metabolites in relation to sensitivity to stress

One-way ANOVA was performed for each brain metabolite followed by a multiple comparison using Tukey-Kramer method. All data represents mean \pm SEM. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. Con, control group (n = 14); Res, resilient group (n = 9); Sus, susceptible group (n = 8).

第5節 考察

大うつ病性障害(MDD)では、中核症状として、快楽の消失 (anhedonia)が、他の症状として、 著名な体重の減少や精神運動の低下が認められる[44]。本研究では、4 週間のストレス負荷により、体重の減少、anhedonia、locomotor activity の減少、不安の増加が認められるうつ病モデルラットを作成することができた。しかしながら、作成されたうつ病モデルラットのすべてが anhedonia を呈するわけではなく、anhedonia を呈する個体(susceptible)と呈さない個体(resilient)が混在していた。Susceptible ラットは快楽の消失だけでなく、crossing や rearing のような locomotor activity の減少や不安の増加も認められた。Resilient ラットにおいても crossing の有意な減少や rearing の減少傾向、不安の増加が認められた。したがって、locomotor activity は resilience の有無ではなく、ストレスへの感受性のマーカーであると考えられる。

Mature BDNF (MW: 14 kDa)は、neurotrophin family に属する神経栄養因子であり、前駆体である pro-BDNF (MW: 32 kDa)の N 末端の切断を経て生合成される[67]。Mature BDNF は tropomyosin-related kinase B (TrkB) 受容体に結合することで、neuron survival や synaptic plasticity を変化させる[56,68,69]。MDD の患者では海馬の萎縮が認められており、海馬の萎縮には BDNF が関与することが報告されている[70,71]。しかしながら、MDD 患者の海馬の BDNF は必ずしも減少するわけではないことが示唆されており[72]、一貫したデータは得られていない。マウスやラットの BDNF 遺伝子は、少なくとも 8 種類の 5' noncoding exons (exon 1-8)と、1 種の protein coding 3' exon から構成される[73]。Ieraci らは、うつ様行動を示すマウスの海馬では、BDNF や total BDNF mRNA の発現には変化はなく、8 種類の splice variants のうち、BDNF-7 mRNA のみが有意に減少したことを確

認している[74]。したがって、本研究で作成された CMS モデルラットの海馬では BDNF の有意な減少が認められなかったが、BDNF の splice variants は変化している可能性がある。

ある化合物が抗うつ効果を持つかどうかを、うつ病モデル動物を用いて評価する際、行動評価の結果だけでなく、海馬における BDNF の変動も評価指標としている文献は複数ある[75-77]。しかしながら、慢性的なストレス負荷により作成されたうつ病モデルラットの海馬では、必ずしも BDNF が減少するわけではないことも報告されている[78]。本研究では臨床に近い症状を呈するうつ病モデルラットを作成したが、海馬における mature BDNF の変化は、stress group では認められず、susceptible group においても認められなかった。すなわち、stress group は、海馬の mature BDNF 量は正常であるにもかかわらず、うつ病様行動を呈していることになる。したがって、本研究結果と既報の文献より、うつ病モデルラットの海馬での BDNF の変動については、臨床研究と同様、一貫したデータが得られていないため、海馬における BDNF の変動から、うつ状態を評価すること、および、ある化合物の抗うつ効果を評価することは現状では難しい。

うつ病モデルラット(stress group)の脳内代謝物プロファイルは、control group と比較し、異なる可能性が示唆されたが、明確に判別することはできなかった。実際、PLS-DA モデルの適合性や予測性は、既報の文献と比較し、十分ではなかった($R^2Y \text{ cum} = 0.679$, $Q^2 \text{ cum} = 0.401$) [79,80]。しかしながら、うつ病モデルラットのうち、ストレスに対し、より感受性の高い(anhedonia を呈する、または、susceptible) ラットだけを用いた場合、それらラットの脳内代謝物プロファイルは明確に判別可能であり、適合性や予測性は向上した($R^2Y \text{ cum} = 0.866$, $Q^2 \text{ cum} = 0.659$)。一方、ストレスに対し、より感受性の低い(anhedonia を呈さない、または resilient) ラットだけを用いた場合、それらラットの脳内代謝物プロファイル

を control group と判別することは、stress group と control group を判別することよりも、困難になることがわかった($R^2Y \text{ cum} = 0.577$, $Q^2 \text{ cum} = 0.243$)。resilient group と control group の脳内代謝物プロファイルを判別することが困難であったこと、および、susceptible group と control group を明確に判別することが可能であったことは、行動評価の結果と一致した。したがって、脳内メタボローム解析は、“うつ”と“非うつ”の判別が可能であるだけでなく、stress susceptibility も評価可能である可能性が示唆された。

本研究で作成されたうつ病モデルラットの海馬組織内では、N-アセチルアスパラギン酸とグルタミン酸が増加し、GABA、酢酸、アスパラギン酸は減少していた。この 5 種類の代謝物のうち、グルタミン酸を除いた 4 種類の代謝物がバイオマーカー候補代謝物であった。

N-アセチルアスパラギン酸は、12 種類の代謝物の中で、最も大きく変動し(control group と比較し、1.26 倍増加)、VIP score も最も大きかったことから、“うつ”と“非うつ”の判別に最も重要な代謝物であることが示唆された。N-アセチルアスパラギン酸がうつ病モデルラットの海馬で増加することは既に報告されている[81]。N-アセチルアスパラギン酸はニューロン内で高密度に存在しており[82]、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼにより、アスパラギン酸とアセチル CoA から生合成される[83]。また、アセチル CoA は酢酸と補酵素 A から生合成される。N-アセチルアスパラギン酸は神経密度のマーカーとしても知られており、N-アセチルアスパラギン酸の増加はニューロン密度の上昇を反映する[84,85]。したがって、本研究では、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼの基質であるアスパラギン酸と酢酸が有意に減少し、生成物である N-アセチルアスパラギン酸が有意に増加していたことから、うつ状態の海馬では、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼの活性が高くなっており、海馬

組織内の神経密度が増加していることが示唆された。実際、うつ病患者の海馬の容積は減少するが[86]、海馬の神経密度は約 30%増加することが報告されている[87]。さらには、Resilient group の海馬組織中の N-アセチルアスパラギン酸量は、control group と susceptible group の中間であったことから、N-アセチルアスパラギン酸は、control, resilient, susceptible の 3 群をも判別できるバイオマーカー候補代謝物であることが示唆された。

GABA はグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)によりグルタミン酸から合成される。海馬において、GABA 作動性神経は neurogenesis や neuronal differentiation に関与することが報告されている[88,89]。CMS モデルラットの海馬では、グルタミン酸が増加し、生成物である GABA が減少していたことから、GAD の活性が抑制され[90]、neurogenesis や neuronal differentiation が変化している可能性がある。加えて、resilient group および susceptible group は、control group と比較し、GABA の低下が認められたが、GABA の前駆体であるグルタミン酸は susceptible group でのみ上昇していたことから、anhedonia を呈した状態ではより強く GAD の活性が抑制されている可能性が示唆された。

以上のことから、本研究で作成された depression model animals の海馬組織では、うつ病患者で認められているような、神経密度や neurogenesis, neuronal differentiation の変化が起こっている可能性が示唆された。また、海馬組織を用いた脳内メタボローム解析は、“うつ”と“非うつ”の判別ができるだけでなく、stress susceptibility の判別もできる可能性がある。さらには、本研究において、N-アセチルアスパラギン酸は、12 種類の代謝物の中で、control, resilient, susceptible の 3 つの状態を評価できる唯一の代謝物である可能性が示唆された。

第6節 小括

ラットに対し、慢性的にストレスを負荷することにより、臨床で認められる症状に類似した行動を示すうつ病モデルラットを作成することができた。しかしながら、ストレスを負荷されたすべてのラットがうつ病の中核症状である *anhedonia* を呈するわけではなく、*anhedonia* を呈しやすい *susceptible* なラットと、うつ病様状態ではない *resilient* なラットが混在していることを確認できた。*Resilient* なラットは、*anhedonia* を呈しにくいことに加え、*rearing* のような *locomotor activity* の有意な減少が認められなかった。

Stress group と *control group* の脳内代謝物プロファイルは、既報で報告されているような、明確な判別はできなかった。しかしながら、*stress group* のラットのうち、ストレスに対して感受性の高い *susceptible* なラットのみで再度解析した場合、*susceptible group* と *control group* は明確に判別可能であった。すなわち、*resilient* なラットの脳内代謝物プロファイルは、“うつ”と“非うつ”の中間に位置しており、うつ状態と健常状態の判別を困難にしていることがわかった。そのため、脳内代謝物プロファイルは、“うつ”と“非うつ”の判別だけでなく、*stress susceptibility* も判別できる可能性がある。

Stress group の海馬では、神経密度のマーカーである N-アセチルアスパラギン酸が増加し、その基質であるアスパラギン酸が減少していたことから、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ活性が亢進、および、*neurogenesis* や *neuronal differentiation* に関わる GABA 作動性神経の GAD の活性が低下している可能性が示唆された。加えて、本節においてアサインされた 12 種類の脳内代謝物のうち、N-アセチルアスパラギン酸は *control*、*resilient*、*susceptible* の 3 つの状態を区別可能なバイオマーカーであることが示唆された。

第3章 バレニクリンが及ぼすラットの行動および 脳内代謝物プロファイルへの影響

第1節 緒言

禁煙補助薬の1つであるバレニクリン(チャンピックス®)は、ニコチン製剤を利用したニコチン代替療法やブプロピオン(Zyban®)と比較し、禁煙成功率が高いことが知られていることから[7,27]、禁煙を推進するための重要な薬物である。

しかしながら、バレニクリンとうつ病等の精神疾患の悪化や自殺との関連が疑われたことから、2009年、FDAはバレニクリンのlabelに最上位の警告である枠組み警告(boxed warning)を追記した[8]。本邦においても、「基礎疾患として有している精神疾患の悪化を伴うことがある」と添付文書の警告欄に記載が追加されている。更には、FAERSの日本語検索システムであるCzeekV(version 3.1.19)によれば、バレニクリンの使用による自殺念慮および自殺行為発現リスクは全薬物の中で第1位である。また、第1章においても、バレニクリンは高い自殺関連事象発現リスクを有することが示唆された。一方で、ランダム化比較試験を対象としたメタアナリシスは、バレニクリンとうつ病もしくは自殺との関連はないと結論づけており[28]、むしろバレニクリンの使用はうつ病のリスクを下げるという報告もある[11]。上記のことから、2016年12月、FDAはバレニクリンのlabelのboxed warningから、上記の警告を削除した[91]。しかしながら、バレニクリン使用者の自殺関連事象リスクを高める要因については十分に調査されていない。

著者は第2章において、HR-MAS ^1H NMR spectroscopy を用いた脳内メタボローム解析はうつと非うつを区別可能であること、および、stress susceptibility も反映可能であることを示した。そこで、第3章では、第1章において高い自殺リスクを有していたバレニクリンに注目し、バレニクリンを投与されたラットが、うつ病様行動を呈するか(第2節)、および、同ラットの脳内代謝物プロファイルがうつ病モデルラットに類似するか(第3節)、そして、脳中に残存するバレニクリン濃度を定量することで、本章の第3節における脳内代謝物プロファイルが、バレニクリンの作用による代謝物の変動によって示されたものであることを確認した(第4節)。

第2節 バレニクリンが及ぼすラットの行動への影響

本節では、バレニクリンを投与されたラットの行動がうつ病様状態を呈するかを調べるために、合計 24 匹のラットを次に示した 4 つのグループに割り当てた(各群 $n = 6$): バレニクリンも慢性ストレス(3 週間)も負荷しない VAR(-) / non-stress group (control group); 慢性ストレスのみを負荷する VAR(-) / stress group (stress group); バレニクリンのみを負荷する VAR(+) / non-stress group; バレニクリンと慢性ストレスの両方を負荷する VAR(+) / stress group。VAR(+) / non-stress group を設定した理由は、バレニクリン自体がうつ病様行動を誘発する可能性があるかを調べるためである。また、VAR(+) / stress group を設定した理由は、バレニクリンの添付文書に記載されているように、基礎疾患として有している精神疾患の悪化を調べるためである。

Figure 12 には、バレニクリンを慢性的に負荷されたラットの行動の変化を示した。上記の全 4 群を two-way ANOVA にかけたところ、6 つの評価項目はいずれもストレスのみの影響を受けることがわかった(Figure 12 の各グラフの右上を参照): weight gain $F_{(1,20)} = 331.38, P < 0.01$; sucrose preference $F_{(1,20)} = 15.18, P < 0.01$; crossing $F_{(1,20)} = 12.11, P < 0.01$; rearing $F_{(1,20)} = 7.69, P < 0.05$; defecation $F_{(1,20)} = 38.68, P < 0.01$; grooming $F_{(1,20)} = 11.57, P < 0.01$ 。慢性的なバレニクリンの投与は、ラットの行動に影響を及ぼさなかった。加えて、バレニクリンとストレスの統計学的交互作用(“stress*VAR” in Figure 12)も認められなかったことから、バレニクリンがストレスへの感受性を高める可能性は低い、すなわち、バレニクリンは精神疾患を増悪させる可能性が低いことが示唆された。

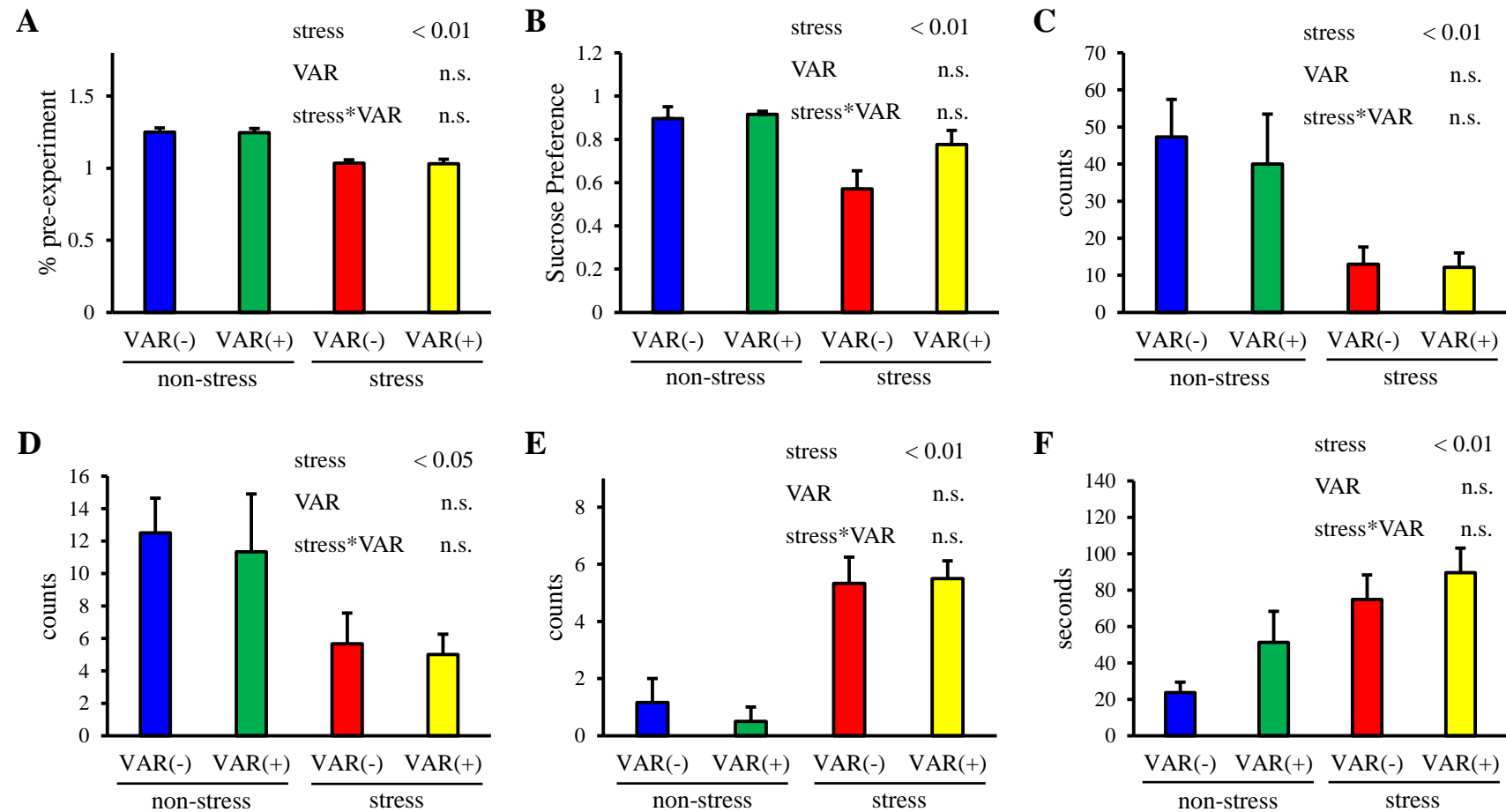


Figure 12. The effect of chronic varenicline administration on behavioural testing.

Weight gain (A), sucrose preference (B), crossing (C), rearing (D), defecation (E), and grooming (F). All data represents mean \pm SEM. Comparison of all four groups was performed by two-way ANOVA. Stress*VAR indicates statistical interaction. VAR, varenicline; n.s., not significant.

第3節 バレニクリン投与ラットの脳内代謝物 プロファイル

本節では、control group、stress group、VAR(+)/non-stress group、VAR(+)/stress group の全4群の脳内代謝物プロファイルを判別することではなく、全4群がどのようなプロファイルを示すかを調べることを目的としているため、第2章の解析手法である PLS-DA ではなく、多段階主成分分析を解析手法とした[92,93]。

多段階主成分分析の結果を Figure 13 に示した。まず、全 237 変数(NMR スペクトルの全領域)を用いた主成分分析の結果、青で示した control group と赤で示した stress group を判別できなかった(Figure 13A)。次に、237 変数の中から、NMR スペクトルの 4.00 – 10.00 ppm に相当する 142 変数を除外し、残りの 95 変数で主成分分析を再度実施した(Figure 13B)。しかしながら、95 変数を用いて主成分分析しても、十分に control group と stress group の判別はできなかった。95 変数を用いた主成分分析の因子負荷プロット(loading plot, Figure 13E)から、個体間変動の大きい代謝物である乳酸(1.30, 1.34 ppm)と酢酸(1.90 ppm)、さらに、吸入麻酔薬として使用したジエチルエーテル(1.18, 3.54 ppm)の計5つの変数を除外し、残りの 90 変数で再び主成分分析を実施した(Figure 13C)。このように、各群の特徴を把握するために、段階を踏んで主成分分析を実施することを多段階主成分分析という。

90 変数で主成分分析をした結果、赤で示した stress group の脳内代謝物プロファイルは、青で示した control group と明確に判別が可能であった(Figure 13C)。すなわち、本章においても、“うつ”と“非うつ”を判別することができた。

緑で示した VAR(+)/non-stress group は、control group に近い脳内代謝物プロフ

ファイルを示した。さらには、バレニクリンと慢性ストレスの両方を負荷された VAR(+) / stress group (黄)は、ストレスを負荷されているにもかかわらず、stress group ではなく、control group に近い脳内代謝物プロファイルを示した。

しかしながら、Figure 13C の脳内代謝物プロファイルをよく観察すると、バレニクリンの投与の有無[有: VAR(+) / non-stress group (緑)と VAR(+) / stress group (黄); 無: control group (青)と stress group (赤)]で分かれているようにも見える。この現象が見られる原因として、バレニクリンの作用が脳内代謝物を変動させた可能性、および、脳中に高濃度にバレニクリン分子が存在し、バレニクリン分子自体がプロファイルに影響を与えている可能性の 2 つが考えられる。前者の場合であれば、脳内代謝物プロファイルの変動を評価できる。しかし、後者の場合では、バレニクリン分子中のプロトンが NMR スペクトルに出現し、代謝物が変動していないにもかかわらず、バレニクリン分子中のプロトンによりプロファイルが分かれてしまった可能性がある。したがって、バレニクリンを投与されたラットの脳中バレニクリン濃度が NMR スペクトルないし代謝物プロファイルに影響を与え得る濃度であるかを調べる必要がある。

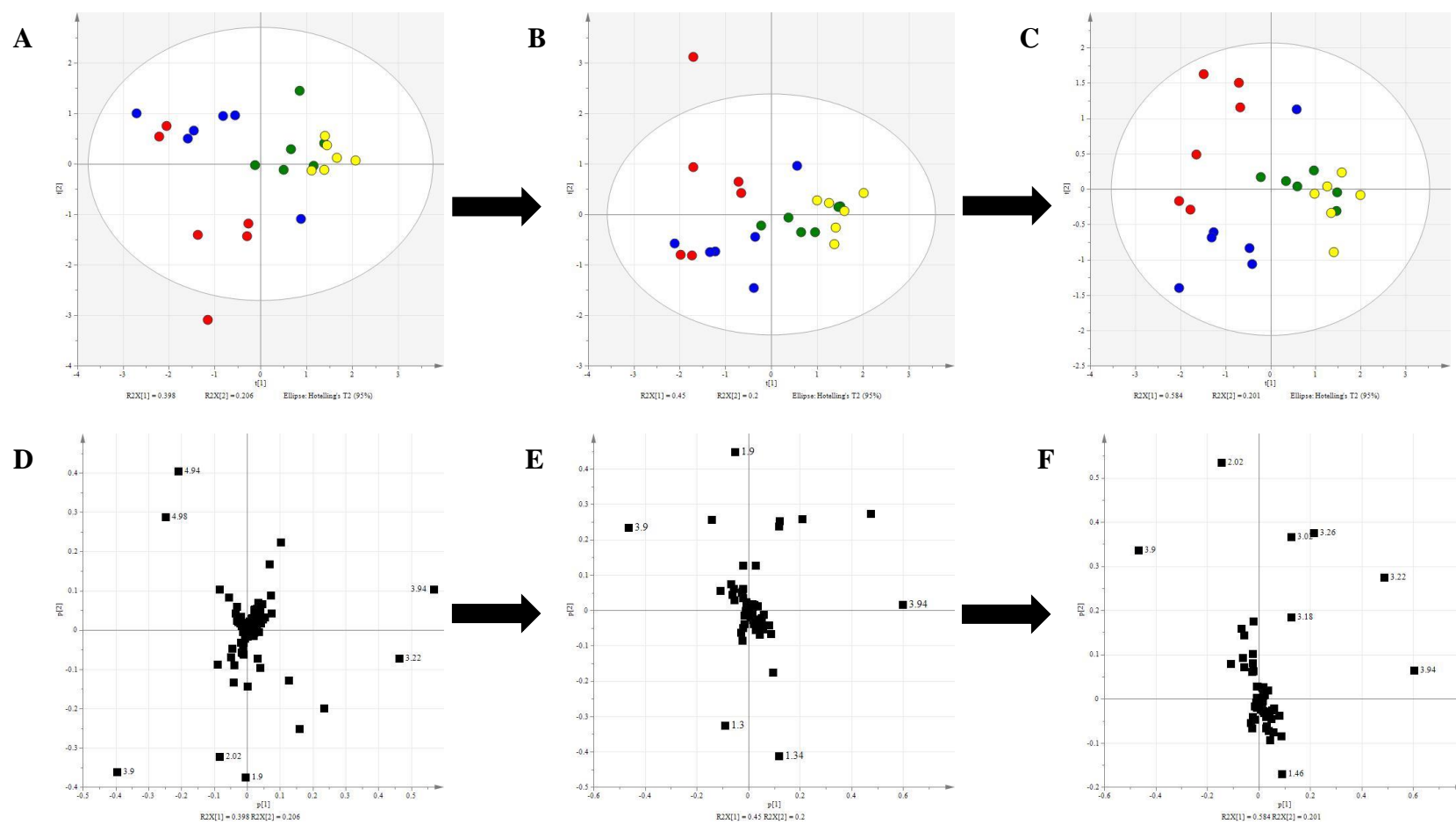


Figure 13. The effect of varenicline on brain metabolic profile using multi-step principal component analysis.

Metabolic profiles of all 237 variables (A), selected 95 variables (B), and selected 90 variables (C) and corresponding loading plot (D-F). Control group (blue), depression group (red), VAR(+) / non-stress group (green), and VAR(+) / stress group (yellow).

第4節 バレニクリン慢性経口投与ラットの 脳中バレニクリン濃度

前節において、NMR スペクトルが脳中に残存するバレニクリン分子中のプロトンの影響を受けることにより、脳内代謝物プロファイルを用いた評価が正確にできていない可能性が示唆された。そこで本節では、脳内メタボローム解析に供したラットと同じラットの脳中バレニクリン濃度を、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて定量した。

Table 6 には、各ラットの脳中バレニクリン濃度を示した。メタボローム解析に用いられたラットの脳中バレニクリン濃度は、すべてのラットにおいて、検出限界(LOD = 0.113 µg/ g brain)、定量下限(LOQ = 0.273µg/ g brain)未満であった。

Table 6. Measurement of brain varenicline concentration.

Group	Identification number	VAR concentration (µg/g brain)
VAR (+) / non-stress group	v001	0.019
	v004	0.017
	v005	-0.014
	v006	0.028
	v009	0.017
	v010	0.025
VAR (+) / stress group	v002	0.015
	v003	-0.014
	v007	0.010
	v008	0.021
	v011	0.022
	v012	0.022

VAR, varenicline.

第5節 考察

バレニクリンは、うつ病等の精神疾患の悪化や自殺との関連が疑われたことから、FDA はバレニクリンの label に最上位の警告である枠組み警告(boxed warning)を追記した[8]。本邦においても、「基礎疾患として有している精神疾患の悪化を伴うことがある」と添付文書の警告欄に記載が追加されている。また、第1章に示したように、後ろ向き研究の1つであり、ROR をリスクの評価指標とした症例対照研究(case-control study)において、バレニクリンがうつ病や自殺を誘発するリスクは高いことが示された。しかしながら、バレニクリンにはリスクがあるという報告に相反する報告も存在しているだけでなく[11,28]、バレニクリン自体にうつ病や自殺を誘発する作用があるかは十分な検討がされてこなかった。そのため、第3章では、実際にバレニクリンをラットに投与し、うつ様行動を呈するかを評価した。

第2節に示したように、ラットの行動に影響を与える要因はストレスのみであり、バレニクリンの投与はラットの行動に影響を与えないことがわかった。加えて、ストレスとバレニクリンの統計学的交互作用が認められなかったことから、バレニクリンが精神疾患(本節ではうつ病)を増悪させる可能性が低いことが示唆された。

次に、第3節に示したように、バレニクリンを投与されたラットの脳内代謝物プロファイルは control group のラットに近いことがわかり、行動評価の結果を支持するものであった。また、バレニクリンとストレスの両方を負荷されたラットの脳内代謝物プロファイルはストレスを負荷されたにもかかわらず、control group のラットに近かった。すなわち、脳内代謝物プロファイルの視点では、バレニクリンには抗うつ作用がある可能性が示唆された。バレニクリンが抗うつ

作用を持つことに関しては、基礎研究[94,95]および臨床研究[11]の両方でその可能性が指摘されている。

第 4 節では、脳中に残存するバレニクリン分子中のプロトンが脳内代謝物プロファイルに影響を及ぼしているかを検討した。すべてのサンプルの脳中バレニクリン濃度は LOD および LOQ を下回っており、残存しているバレニクリン濃度は非常に低いことがわかった。したがって、バレニクリン分子中のプロトン自体が脳内代謝物プロファイルを歪曲させている可能性は低く、第 3 節の脳内代謝物プロファイルはバレニクリン投与によって変動した生体内代謝物の変動を捉えていることがわかった。したがって、第 3 節および第 4 節より、バレニクリンを投与されたラットの脳内代謝物プロファイルは control group のラットの脳内代謝物プロファイルに近づく、すなわち、バレニクリンがうつ病を誘発させる可能性が低いことが示唆された。

第6節 小括

症例対象研究や症例報告は、バレニクリンによるうつ病や自殺リスクを支持しているが、エビデンスレベルが高いとされる前向きコホート研究ではこのリスクは否定されている。

第3章では、実際にラットにバレニクリンを投与することにより、そのラットがうつ病様行動を呈するか、また、脳内代謝物プロファイルはうつ状態に近いかを調べた。結果として、ラットはうつ病様行動を呈さず、脳内代謝物プロファイルは、バレニクリンには抗うつ作用があるという既報の文献を支持していた。したがって、バレニクリンを使用した症例でうつ病や自殺はバレニクリン以外のリスク要因によって発現しているのかもしれない。

第4章 バレニクリンと各種禁煙補助薬の自殺関連 事象発現タイミングから推定されるうつ病・ 自殺のリスク要因

第1節 緒言

既に述べたように、喫煙は様々な疾患のリスク因子である。また、喫煙は健康に対し有害な影響をもたらすことにより、全世界で年間 600 万人以上を死亡させるだけでなく、非常に大きな経済的損失をもたらす[23-25]。したがって、喫煙の続発疾患を予防するという点で、費用対効果の高い禁煙が推奨されている[26]。

現在、 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体部分作動薬であるバレニクリン(Chantix[®])やノルエピネフリン・ドパミン再取り込み阻害薬であるブプロピオン(Zyban[®])、ニコチン製剤が禁煙補助薬として臨床的に使用されており、とりわけ、バレニクリンの禁煙成功率(abstinence rate)はブプロピオンやニコチン代替療法と比較し、高いことが知られている[27,96]。

しかしながら、バレニクリンの使用と抑うつ状態や自殺念慮、自殺行為との関連が疑われたことから FDA は boxed warning を出した[8]。このことを支持するように、症例対象研究や症例報告では、バレニクリンと neuropsychiatric event との関連を指摘しており[97,98]、第1章においては、バレニクリン使用症例の自殺関連事象発現リスクが高いことが明らかとなった。一方で、ランダム化比較試験およびメタアナリシスでは、バレニクリンと neuropsychiatric event との関連は否定されている[10,28]。また、第3章においては、バレニクリンがうつ病様行動の要因ではないこと、および、バレニクリン投与ラットの脳内代謝物プロファイル

は健常状態に近いことが示唆された。

2016 年に FDA が改訂したバレニクリンの label には、依然として、うつ病や自殺のような neuropsychiatric event に関する記載が残されている。しかしながら、neuropsychiatric event のリスク要因が禁煙に伴うニコチン退薬症候である可能性に関しても言及されている[99]。ニコチン退薬症候は禁煙開始直後(2-3 日以内)に急激に出現し、その後徐々にベースラインまで回復することが知られている[100]。禁煙補助薬使用中に発現する neuropsychiatric event のリスクについては、バレニクリンのみに指摘されているわけではなく、ブプロピオンにおいてもその関連性が疑われている[8]したがって、もし禁煙補助薬使用中に発現する neuropsychiatric event の要因がニコチン退薬症候であるならば、その発現タイミングは、禁煙補助薬の種類によらず、使用開始直後に集中する可能性がある。

そこで第 4 章では、バレニクリンやブプロピオン、ニコチン製剤のような、各種禁煙補助薬を使用した症例の自殺関連事象発現タイミングを調べた(第 2 節)。そして、第 3 節では、バレニクリン、ブプロピオン、ニコチン製剤の 3 種類の禁煙補助薬の自殺関連事象発現タイミングの類似性から、ニコチン退薬症候が要因となり得るかについて考察した。

第2節 各種禁煙補助薬の自殺関連事象発現

タイミング

本節では、X-bar chart の概念を参考として、バレニクリン使用中に発現する自殺関連事象の発現タイミングを調査した。X-bar chart はそもそも、製造業において製品の品質が一定に保たれているかを評価するために利用される。基本的な概念は、ロットの中からサンプルを採取し、サンプルの平均値(mean)とバラつきを求めた後、管理限界線を引き、管理限界線の中に製品の品質が収まっているかを確認することである[101]。著者はこの概念を利用し、FAERS 報告症例の中からバレニクリン使用症例を抽出後、X-bar chart を用いて自殺関連事象の発現タイミングを調べた結果を Figure 14 に示した。

バレニクリンを使用し、かつ、自殺関連事象を報告した症例のうち、解析対象となった症例は 734 症例であった。734 症例のうち、666 症例はバレニクリンの使用を開始した後に自殺関連事象を報告した症例であり(Week 1 to 16)、残りの 68 症例はバレニクリンの使用を開始する前に自殺関連事象を報告した症例である(Week -4 to -1)。

後者の 68 症例は、バレニクリンを使用する前、すなわち、禁煙を開始する前に自殺関連事象が発現した症例であるため、これらの症例を用いることにより、喫煙期間中の自殺関連事象のリスクを評価できる。禁煙だけでなく、喫煙も自殺のリスク要因になり得ることから[102]、発現タイミングをより正確に評価するためには、喫煙歴の影響(喫煙期間中のリスク)も取り除く必要がある。そこで著者は、X-bar chart の概念を参考に、これら 68 症例の「1 週間毎の自殺関連事象報告症例数の平均値+ $3.0 \times \text{standard deviation (SD)}$ 」を算出した。算出された値を

ベースラインとして、**Week 1** 以降のいずれかの週の自殺関連事象報告症例数がこのベースラインを超えていれば、バレニクリンによる禁煙治療が自殺関連事象の発現に影響を及ぼしているとみなした。

バレニクリン使用症例における自殺関連事象の発現タイミングを **Figure 14A** に示した。ベースライン(平均値 $\pm 3.0 \times \text{SD}$)は 37.05 症例であったことから、38 以上の報告症例数がある週、すなわち、ベースラインを超えた週は、**Week 1 to 3** と **Week 5** であった。

ブプロピオン使用症例における自殺関連事象の発現タイミングを **Figure 14B** に示した。ブプロピオンを使用し、かつ、自殺関連事象を報告した症例のうち、解析対象となった症例は 22 症例であった。22 症例のうち、20 症例はブプロピオンの使用を開始した後に自殺関連事象を報告した症例であり(**Week 1 to 16**)、残りの 2 症例はブプロピオンの使用を開始する前に自殺関連事象を報告した症例である(**Week -4 to -1**)。ベースラインは 2.23 症例であったため、3 以上の報告症例数がある週、すなわち、ベースラインを超えた週は、**Week 1 to 3** であった。したがって、**Week 1 to 3** の期間は、ブプロピオンによる禁煙治療が自殺関連事象に影響を及ぼしているとみなした。

ニコチン製剤使用症例における自殺関連事象の発現タイミングを **Figure 14C** に示した。ニコチン製剤を使用し、かつ、自殺関連事象を報告した症例のうち、解析対象となった症例は 14 症例であった。14 症例のうち、11 症例はニコチン製剤の使用を開始した後に自殺関連事象を報告した症例であり(**Week 1 to 16**)、残りの 3 症例はニコチン製剤の使用を開始する前に自殺関連事象を報告した症例である(**Week -4 to -1**)。ベースラインは 5.25 症例であったため、6 以上の報告症例数がある週、すなわち、ベースラインを超えた週は、**Week 1** であった。したがって、**Week 1 to 3** の期間は、ニコチン製剤による禁煙治療が自殺関連事象

に影響を及ぼしているとみなした。ただし、解析対象となったニコチン製剤使用症例数は 14 症例であり、少なかった。

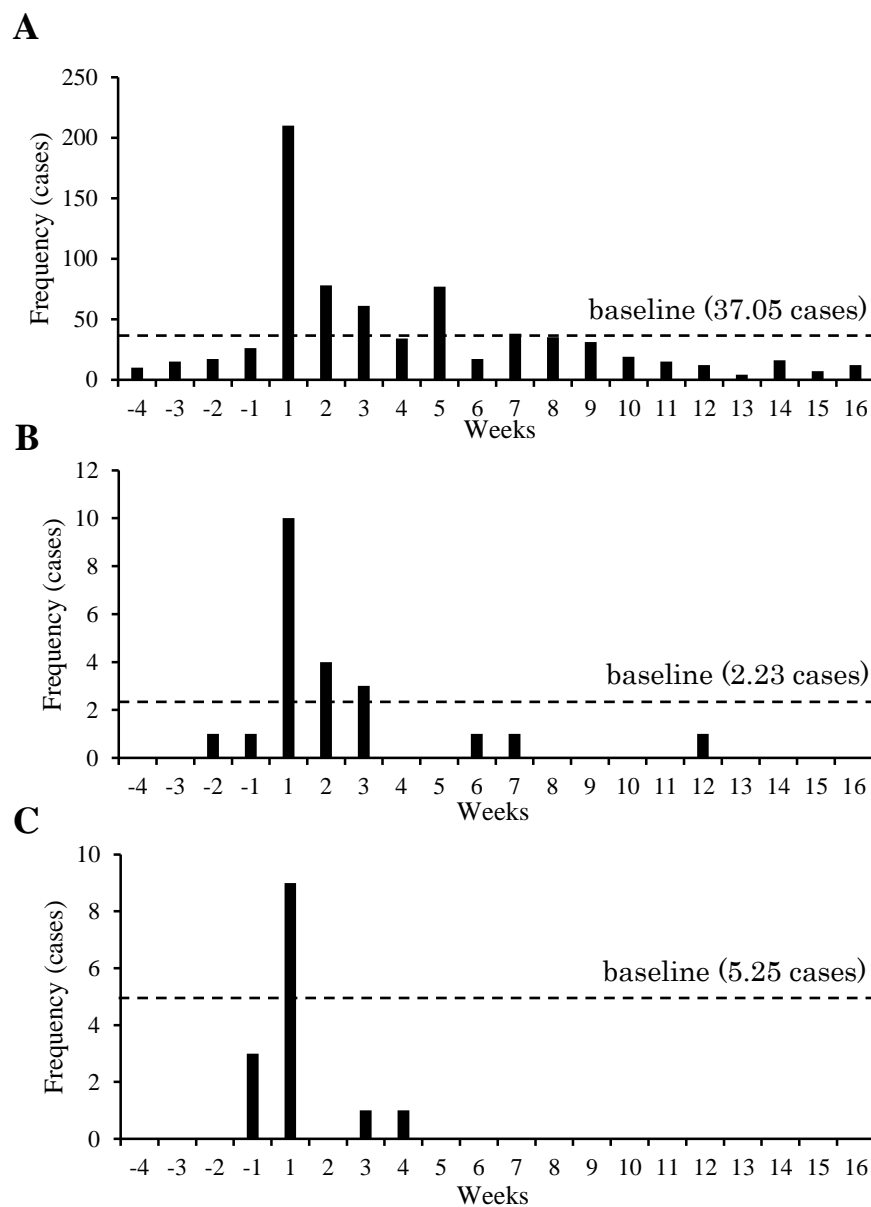


Figure 14. Number of suicide-related event reports per week in case undergoing smoking cessation treatment.

Week -4 to Week -1 represents cases that reported suicide related event before starting smoking cessation treatment and Week 1 and over represents cases that reported suicide related event after starting smoking cessation treatment with varenicline (A), bupropion (B), and nicotine replacement therapy (C).

第3節 考察と小括

第2節より、バレニクリン、ブプロピオン、ニコチン製剤の自殺関連事象は、使用開始後1週間以内に最も発現しやすいことが明らかとなった。加えて、バレニクリンによる禁煙治療が原因と考えられる自殺関連事象は、その大部分がバレニクリンの使用開始後3週間以内(Week 1 to 3)に発現することがわかった。また、ブプロピオンによる禁煙治療が原因と考えられる自殺関連事象においても、使用開始後3週間以内(Week 1 to 3)に発現することがわかった。ニコチン製剤に関しては、3種類の禁煙補助薬の中で最も解析対象症例数が少なかったが、やはり使用開始直後(Week 1)に自殺関連事象が発現することがわかった。したがって、自殺関連事象の発現タイミングは、使用している禁煙補助薬の種類に関わらず、使用開始後1週間以内にピークがあり、長くとも5週間以内には自殺関連事象の発現に関わるシグナルは消失することが明らかとなった。

禁煙開始後に認められるニコチン退薬症候は、禁煙開始後2日以内に出現し始め、1週間以内にピークとなり、4週間を目安に禁煙前の状態へと戻っていくことが複数の文献により明らかとなっている[100,103,104]。したがって、禁煙補助薬使用中に発現する自殺関連事象の発現タイミングと、ニコチン退薬症候の発現タイミングは酷似していたことから、バレニクリンを使用した禁煙治療中に発現する **neuropsychiatric event** の主なリスク要因は、バレニクリンではなく、ニコチン退薬症候の可能性が高いことが示唆された。

第5章 ニコチン退薬症候モデルラットの 脳内メタボローム解析

第1節 緒言

バレニクリンは抑うつ状態や自殺念慮、自殺行為のような neuropsychiatric event との関連が疑われ、2009 年、FDA は boxed warning を出した[8]。症例対象研究や症例報告だけでなく[97,98]、本学位論文の第1章においても、バレニクリンの neuropsychiatric event 誘発リスクが高いことが示された。しかしながら、Anthenelli らは、禁煙治療中に発現する neuropsychiatric event に関して、禁煙補助薬と placebo 間でリスク差が認められないことを大規模臨床試験で確認している[10]。

バレニクリンそのものが neuropsychiatric event を誘発する可能性や、患者の喫煙歴がうつ病の発現に影響を及ぼす可能性[102]、さらには、禁煙治療時に発現するニコチン退薬症候が neuropsychiatric event を誘発する可能性[99,105]のように、様々な可能性がバレニクリン使用期間中に発現する neuropsychiatric event のリスク要因として挙げられる。

著者は、第1章において、バレニクリン使用症例の自殺関連事象の発現リスクが高いことを見出したが、なぜバレニクリン使用症例で同リスクが高まるのか、その要因についてまでは調査できなかった。第3章において、バレニクリンを投与されたラットは、うつ病モデルラットのような行動を示さず、脳内代謝物プロファイルにおいても、健常なラットに近いプロファイルを示したこと、また、バレニクリンの neuropsychiatric event 発現リスクが placebo と変わらないことか

ら、バレニクリンに **neuropsychiatric event** を引き起こす作用がある可能性は低かった。第 4 章において、禁煙補助薬の種類によらず自殺関連事象の発現タイミングが、使用開始初期に集中していたことから、ニコチン退薬症候がリスク要因である可能性が示唆された。

そこで第 5 章では、ラットに慢性的にニコチンを投与し、一定の退薬期間を設けることでニコチン退薬症候モデルラットを作成し(第 2 節)、同モデルラットの脳内代謝物プロファイルが対照ラットと判別可能かどうかを調べ(第 3 節)、さらには、ニコチン退薬症候モデルラットの脳内代謝物の相対的変動を検討した(第 4 節)。最後に、ニコチン退薬症候モデルラットとうつ病モデルラットの脳内代謝物変動の類似性について考察した(第 5 節)。

第 2 節 ニコチン退薬症候モデルラットの作成

本節では、ニコチンを慢性的に投与されたラットに 12 時間および 18 時間のニコチン退薬期間を設け、これらのラットがニコチン退薬症候状態であるかを調べるために行動評価を実施した。

ニコチンを慢性的に投与され、12 時間の退薬期間を設けられた群を Nic_12 group、また、18 時間の退薬期間を設けられた群を Nic_18 group とした。また、対照群として、生理食塩液を投与され、同様の退薬期間を設けられた群を Sal_12 group および Sal_18 group とした。

Figure 15 には、Nic_12 group および Sal_12 group のニコチン投与期間中の body weight と food intake の推移(Figure 15A, B)、および、12 時間の退薬期間後の行動評価の結果を示した(Figure 15C-E)。Day 0 (pre-experiment)において、Nic_12 group と Sal_12 group の body weight が同じであることを確認できた。ニコチン投与期間中において、Nic_12 group の body weight および food intake は、Sal_12 group と比較し、有意に減少した[106,107]。この結果は、喫煙者で認められる食欲の減退や体重増加率の減少を支持するものであった[108]。ニコチンの最終投与から 12 時間の退薬期間を設けた場合、Nic_12 group は、locomotor activity の指標である crossing や rearing が有意に低下し(Figure 15C, D)、不安の指標である grooming は有意に増加した(Figure 15E)。既報の文献において、ニコチン退薬症候状態の齧歯類は、locomotor activity が減少し、不安は増加するとされている[109,110]。したがって、Nic_12 group はニコチン退薬症候状態であることが確認できた。

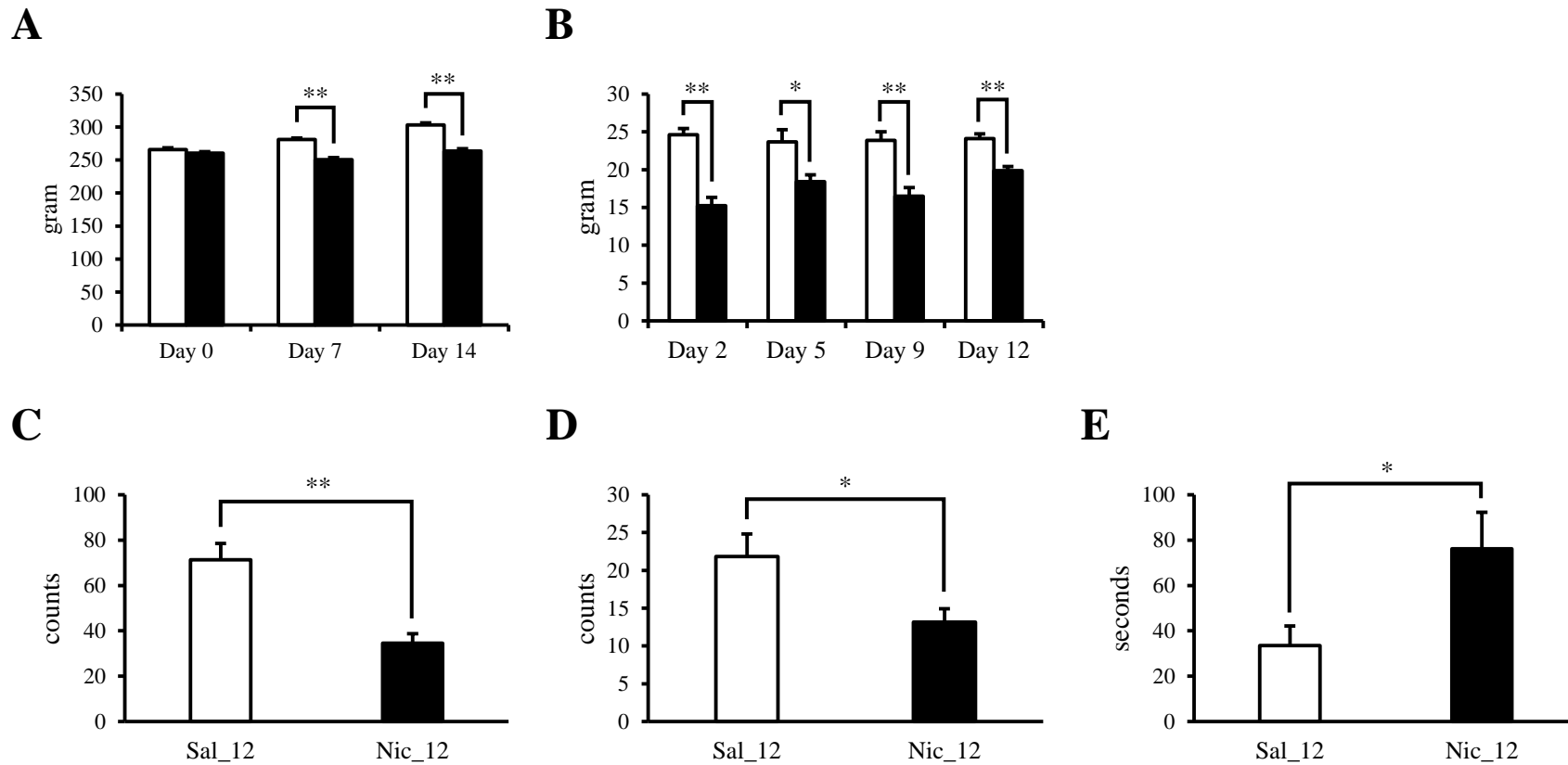


Figure 15. Results of the behavioural testing during the nicotine dosing period and 12 h after nicotine withdrawal Body weight (A) and food intake (B) during the nicotine dosing period. Crossing (C), rearing (D), and grooming time (E) 12 h after nicotine withdrawal. Open columns represent the Sal_12 group and Closed columns represent the Nic_12 group. Comparison of two groups was performed by two-tailed Student's *t*-test. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. Mean \pm SEM.

Figure 16 には、Nic_18 group および Sal_18 group のニコチン投与期間中の body weight と food intake の推移(Figure 16A, B)、および、18 時間の退薬期間後の行動評価の結果を示した(Figure 16C-E)。Day 0 (pre-experiment)において、Nic_18 group と Sal_18 group の body weight が同じであることを確認できた。ニコチン投与期間中において、Nic_18 group の body weight および food intake は、Sal_18 group と比較し、有意に減少した。この結果は、喫煙者で認められる食欲の減退や体重増加率の減少を支持するものであった[108]。ニコチンの最終投与から 18 時間の退薬期間を設けた場合、Nic_18 group の crossing や rearing は、Sal_18 group と比較し、有意に低下しなかった(Figure 16C, D)。また、grooming に関しても、Nic_18 group は Sal_18 group と比較し有意に増加しなかった(Figure 16E)。したがって、Nic_18 group はニコチン退薬症候状態から回復した状態であるとみなすことができた。

上記のことから、慢性的にニコチンを投与し、ニコチンの最終投与から 12 時間の退薬期間を設けることにより、ニコチン退薬症候モデルラットを作成することができた。また、ニコチンの最終投与から 18 時間の退薬期間を設けることにより、ニコチン退薬症候から回復した状態のラットを作成することができた。

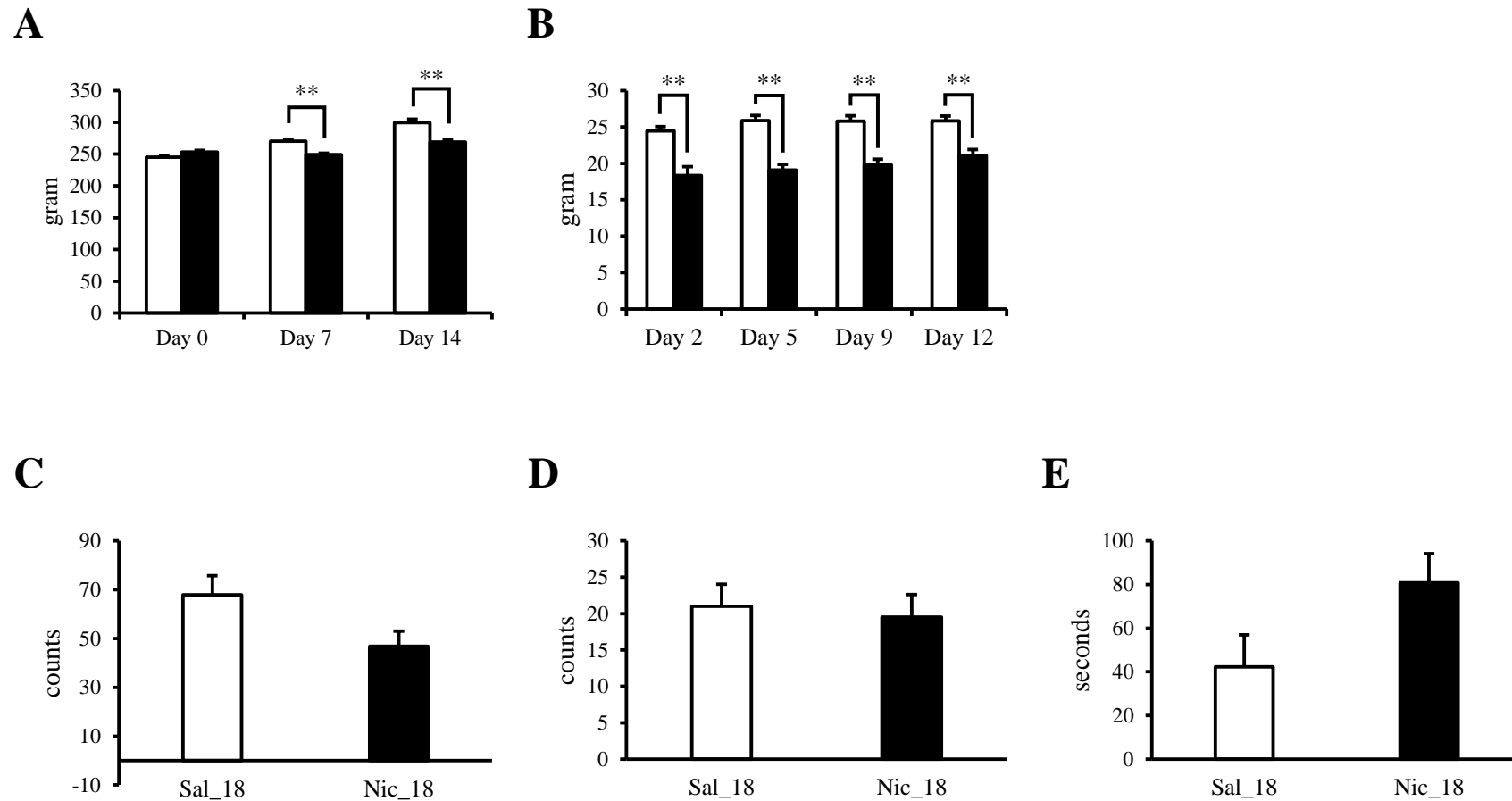


Figure 16. Results of the behavioural testing during the nicotine dosing period and 18 h after nicotine withdrawal Body weight (A) and food intake (B) during the nicotine dosing period. Crossing (C), rearing (D), and grooming time (E) 18 h after nicotine withdrawal. Open columns represent the Sal_18 group and Closed columns represent the Nic_18 group. Comparison of two groups was performed by two-tailed Student's *t*-test. **: $P < 0.01$. Mean \pm SEM.

第3節 ニコチン退薬症候モデルラットおよび退薬 症候回復モデルラットのメタボローム解析

前節において、ニコチンを慢性的に投与し、最終投与から 12 時間の退薬期間を設けられたラットはニコチン退薬状態であり、18 時間の退薬期間を設けられたラットは退薬症候から回復した状態であることがわかった。そこで本節では、ニコチン退薬症候モデルラットと退薬症候回復モデルラットの脳内代謝物プロファイルについて示した。

第2章と同様に、ニコチン退薬症候モデルラット海馬の NMR スペクトルを HR-MAS ^1H NMR spectroscopy を用いて計測した。海馬 NMR スペクトルを PLS-DA にかけた結果を Figure 17 に示した。ニコチン退薬症候状態である Nic_12 group の脳内代謝物プロファイルは、Sal_12 group と明確に判別可能であった(Figure 17A)。Nic_12 group と Sal_12 group の PLS-DA モデルの適合性と予測性を表す R^2Y cum value と Q^2 cum value はそれぞれ、0.930 と 0.735 であった。左側の置換されたすべての R^2Y value (blue)および Q^2 value (green)は、一番右のオリジナルの値(R^2Y cum = 0.930, Q^2 cum = 0.735)と比較し、低かった(Figure 17B) [64]。上記のことから、Nic_12 group と Sal_12 group の PLS-DA モデルの妥当性が確保され、PLS-DA モデルの適合性および予測性は共に高い値を示した[65]。

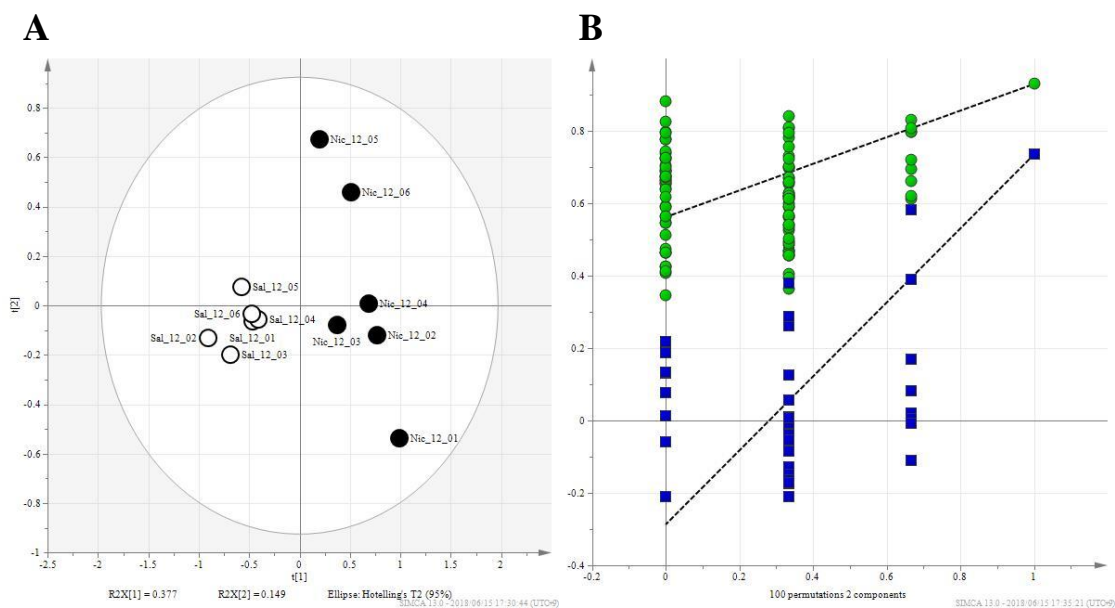


Figure 17. PLS-DA score plot (A) and statistical validation (B) of the nicotine withdrawal symptom and control groups

The brain metabolic profile (A) for each rat ($n = 6/\text{group}$) and permutation plot (B) obtained by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) that were performed to the integral value of each bucket of the hippocampal tissue nuclear magnetic resonance spectra (0.20–10.00 ppm). In the metabolic profile, the nicotine withdrawal symptom group (Nic_12 group) is shown by the closed circles, while the control group (Sal_12 group) is shown by the open circles. $R^2Y \text{ cum} = 0.930$, $Q^2 \text{ cum} = 0.735$.

退薬症候回復モデルラットの海馬 NMR スペクトルを PLS-DA にかけた結果を Figure 18 に示した。退薬症候から回復した状態である Nic_18 group の脳内代謝物プロファイルは、Sal_18 group と明確に判別可能であった(Figure 18A)。また、Nic_18 group と Sal_18 group の PLS-DA モデルの適合性と予測性を表す R^2Y cum value と Q^2 cum value はそれぞれ、0.781 と 0.033 であった。左側の置換された R^2Y value (blue)および Q^2 value (green)は、一番右のオリジナルの値と比較し、一部高値を示した(Figure 18B)。そのため、Nic_18 group と Sal_18 group のプロファイルは明確に判別可能ではあるものの、PLS-DA モデルの統計学的妥当性は低く、PLS-DA モデルの予測性は非常に低い値を示した。

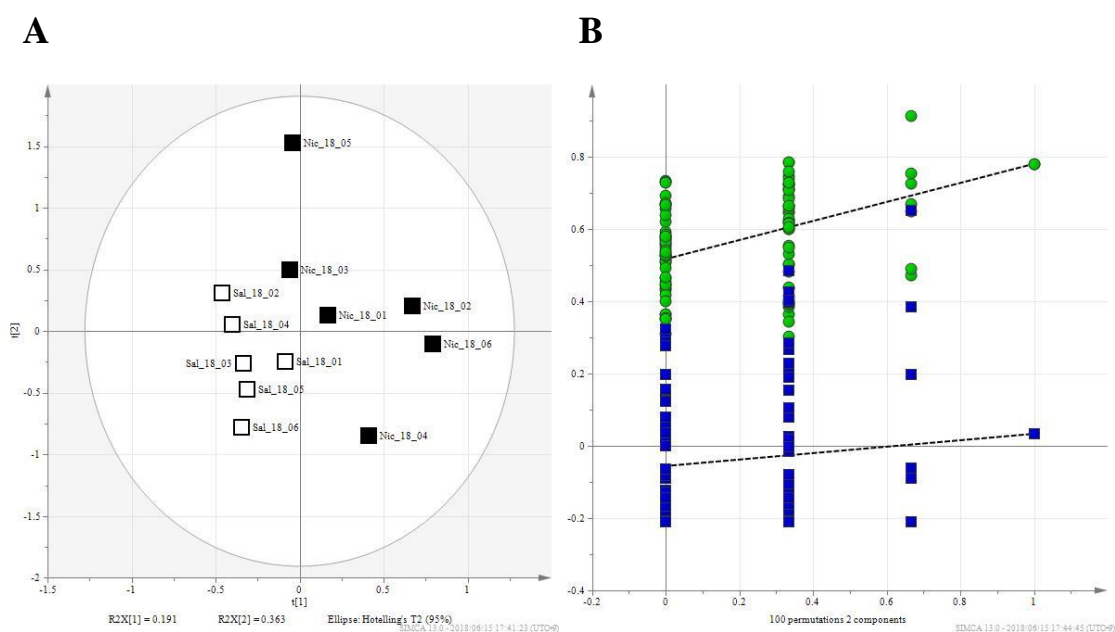


Figure 18. PLS-DA score plot (A) and statistical validation (B) of the group that recovered from nicotine withdrawal symptoms and the control group

The brain metabolic profile (A) for each rat ($n = 6/\text{group}$) and permutation plot (B) obtained by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) that were performed to the integral value of each bucket of the hippocampal tissue nuclear magnetic resonance spectra (0.20–10.00 ppm). In the metabolic profile, the nicotine withdrawal symptom group (Nic_18 group) is shown by the closed squares, while the control group (Sal_18 group) is shown by the open squares. R^2Y cum = 0.781, Q^2 cum = 0.033.

第4節 ニコチン退薬症候モデルラットおよび退薬 症候回復モデルラットの脳内代謝物変動

Table 7 には、Sal_12 group と比較した、Nic_12 group の各脳内代謝物の相対的変動を示した。ラット海馬の NMR スペクトルから、12 種類の脳内代謝物をアサインすることが可能であり、アサインされた 12 種類の代謝物のうち、two-tailed student's *t*-test により算出された *P* value が <0.05 であり、かつ、VIP スコアの 95% CI 下限値が >1.0 であった脳内代謝物をバイオマーカーの候補代謝物とみなした [66]。

Nic_12 group のラット海馬では、Sal_12 group と比較し、N-アセチルアスパラギン酸($P < 0.01$)やグルタミン酸($P < 0.05$)が有意に増加しており、アスパラギン酸 ($P < 0.05$)、GABA ($P < 0.01$)、クレアチン($P < 0.05$)が有意に減少していた。有意に変動していた 5 種類の代謝物のうち、VIP スコアの 95%CI 下限値が >1.0 であった脳内代謝物は、N-アセチルアスパラギン酸、GABA、クレアチンの 3 種類であり、この 3 種類の脳内代謝物をバイオマーカーの候補代謝物とみなした。

Table 8 には、Sal_18 group と比較した、Nic_18 group の各脳内代謝物の相対的変動を示した。Nic_18 group のラット海馬では、Sal_18 group と比較し有意に変動している代謝物は見当たらず、VIP スコアの 95%CI 下限値が >1.0 である代謝物も検出できなかった。

Table 7. Changes in metabolites in the hippocampus 12 h after nicotine withdrawal

Metabolite	Chemical Shift (ppm)	Changed ^a (fold difference ^b)	<i>P</i> value	VIP score	VIP score 95%CI
N-acetylaspartate	2.01, 2.49, 2.68	↑ (1.32)	< 0.01	8.52	6.71 – 10.33
GABA	1.90, 2.29, 3.01	↓ (0.85)	< 0.01	6.55	5.21 – 7.90
Phosphocholine	3.21, 3.58, 4.16	(0.96)	0.09	4.18	1.79 – 6.58
Creatine	3.03, 3.92	↓ (0.89)	0.04	3.94	1.83 – 6.05
Lactate	1.32, 4.10	(0.99)	0.31	2.00	-1.03 – 5.04
Myo-inositol	3.27, 3.52, 3.61	(1.03)	0.23	1.98	-0.54 – 4.49
Choline	3.19, 3.51, 4.05	(0.95)	0.16	1.93	0.41 – 3.46
Glutamate	2.04, 2.12, 2.33	↑ (1.09)	0.03	0.90	0.24 – 1.55
Aspartate	2.68, 2.80, 3.89	↓ (0.90)	0.02	0.83	0.32 – 1.34
Glutamine	2.14, 2.43, 3.77	(0.93)	0.52	0.70	0.08 – 1.33
Alanine	1.47, 3.77	(0.99)	0.74	0.43	-0.14 – 1.00
Acetate	1.91	(0.96)	0.32	0.17	0.02 – 0.33

^a Arrows represent an increase or decrease of the metabolite compared to the control group. ^b Fold differences were calculated by ratios of the mean of the integral value of each bucket and are shown in parentheses. GABA, γ -aminobutyric acid; VIP, variable importance in projection; CI, confidence interval.

Table 8. Changes in metabolites in the hippocampus 18 h after nicotine withdrawal

Metabolite	Chemical Shift (ppm)	Changed ^a (fold difference ^b)	<i>P</i> value	VIP score	VIP score 95% CI
Lactate	1.32, 4.10	(1.05)	0.22	5.94	-0.76 – 12.64
Choline	3.19, 3.51, 4.05	(0.90)	0.05	5.71	0.11 – 11.32
Creatine	3.03, 3.92	(1.00)	0.99	3.85	0.50 – 7.20
Myo-inositol	3.27, 3.52, 3.61	(0.97)	0.33	3.50	0.36 – 6.63
GABA	1.90, 2.29, 3.01	(0.96)	0.32	3.02	-2.48 – 8.52
N-acetylaspartate	2.01, 2.49, 2.68	(1.06)	0.44	2.94	-1.09 – 6.97
Phosphocholine	3.21, 3.58, 4.16	(0.99)	0.67	1.94	-1.25 – 5.14
Alanine	1.47, 3.77	(0.96)	0.50	1.19	-1.65 – 4.04
Glutamate	2.04, 2.12, 2.33	(1.04)	0.42	0.71	-0.88 – 2.29
Glutamine	2.14, 2.43, 3.77	(0.98)	0.52	0.60	0.08 – 1.13
Aspartate	2.68, 2.80, 3.89	(0.99)	0.77	0.18	-0.37 – 0.73
Acetate	1.47, 3.77	(0.97)	0.57	0.17	-0.02 – 0.36

^a An increase or decrease of the metabolite compared to the control group. ^b Fold differences were calculated by ratios of the mean of the integral value of each bucket and are shown in parentheses. GABA, γ -aminobutyric acid; VIP, variable importance in projection; CI, confidence interval.

第 5 節 考察

ラットに慢性的にニコチンを投与することで、喫煙者に認められる食欲の減退や体重増加率の減少を呈し[106-108]、さらに、ニコチンの最終投与から 12 時間の退薬期間を設けることで、locomotor activity の減少や不安の増加を呈するニコチン退薬症候モデルラットを作成することができた[109-111]。また、18 時間の退薬期間を設けることで、ニコチン退薬症候から回復したモデルラットを作成できた。

ニコチン退薬症候状態の脳内代謝物プロファイルは、健常な状態とは明らかに異なっていることがわかり、判別モデルの統計学的妥当性も非常に高かった。したがって、脳内メタボローム解析が、ニコチン退薬症候状態と健常状態を判別可能なツールになり得ることが示唆された。一方、ニコチン退薬症候から回復した状態の脳内代謝物プロファイルも健常な状態とは異なる可能性が示唆されたが、判別モデルの統計学的妥当性、とりわけ、予測性が低いことがわかった。したがって、脳内メタボローム解析は、ニコチン退薬症候から回復した状態と健常状態の判別モデルへの適合性は良好であったが、両状態の予測性は極めて低いことが示唆された。

ニコチン退薬症候状態のラット海馬では、N-アセチルアスパラギン酸と GABA、クレアチンの 3 種類の代謝物が有意に変動しており、かつ、VIP スコアも大きかった。したがって、これら 3 種類の代謝物がニコチン退薬症候状態と健常状態の判別に大きく寄与する代謝物であることが明らかとなった。

N-アセチルアスパラギン酸は、ニコチン退薬症候状態と健常状態の判別に最も寄与する代謝物であることがわかり、その前駆体であるアスパラギン酸は有意に減少していた。そのため、ニコチン退薬症候状態では、海馬組織内の N-ア

セチルアスパラギン酸の増加、および、アスパラギン酸の減少から、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼの活性が高くなっていることが示唆される。うつ病状態のラット海馬の脳内代謝物プロファイルの判別に最も寄与するのも N-アセチルアスパラギン酸であり、N-アセチルアスパラギン酸は、ニコチン退薬症候状態のラット海馬と同様、増加しており、その前駆体であるアスパラギン酸も、両状態で共通して減少していた。したがって、うつ病状態、および、ニコチン退薬症候状態では、N-アセチルアスパラギン酸が共通して増加していることが明らかになっただけでなく、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ活性が共通して高くなっているかもしれない。

GABA はニコチン退薬症候状態と健常状態の判別に大きく寄与するバイオマーカー候補代謝物の 1 つであり、ニコチン退薬症候状態の海馬では、GABA は有意に減少し、その前駆体であるグルタミン酸は有意に増加していた。このことから、ニコチン退薬症候状態の海馬では、GAD 活性が高くなっている可能性がある。GABA は、ニコチン退薬症候状態の判別に寄与する重要なマーカーである可能性があるだけでなく、第 2 章において、うつ病状態の判別にも寄与する重要なマーカーであることが明らかとなっており、両状態で共通して減少していた。加えて、GABA だけでなく、その前駆体であるグルタミン酸も両状態で共通して変動していたことから、GAD 活性も両状態で共通して低下している可能性がある。

もう 1 つのバイオマーカー候補代謝物であるクレアチンは、エネルギー貯蔵に関与することが報告されているほか[112]、神経保護作用を有する可能性も指摘されている[113]。ニコチン退薬症候状態の海馬では、クレアチンが減少していたことから、海馬組織のエネルギー代謝に何らかの異常が生じている可能性が示唆された。しかしながら、NMR スペクトルから、クレアチンのリン酸化体

であるクレアチンリン酸や、リン酸の供給体である ATP をアサインできなかったため、エネルギー生産が増加しているのか、減少しているかまでは不明である。また、クレアチンの神経保護作用は、クレアチンリン酸でも認められているため、クレアチンリン酸の相対的変動が検出できていない現状では、ニコチン退薬症候状態の海馬では、神経が保護されているかまでは不明である。

上記のことから、うつ病状態の判別に最も寄与する N-アセチルアスパラギン酸、および、2 番目に寄与する GABA は、ニコチン退薬症候状態の判別においても同じ順序で大きく寄与し、両状態で同様の変動を示した。また、これら 2 種類の代謝物の前駆体(アスパラギン酸、グルタミン酸)も両状態で同様の変動をしていたことから、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼや GAD の活性もうつ病状態とニコチン退薬症候状態で共通して変化している可能性がある。

第6節 小括

ラットに慢性的にニコチンを投与し、ニコチンの最終投与から 12 時間の退薬期間を設けることで、ニコチン退薬症候モデルラットを作成することができた。

脳内メタボローム解析は、ニコチン退薬症候状態と健常状態を明確に判別可能であり、統計学的妥当性も良好であった。

ニコチン退薬症候状態の判別に最も寄与する脳内代謝物は N-アセチルアスパラギン酸であり、次いで GABA であった。これらの代謝物は、うつ病状態の判別にも大きく寄与する代謝物であり、寄与の大きさの順序も同じであった。加えて、これら 2 種類の代謝物の前駆体も、ニコチン退薬症候状態とうつ病状態とで共通した変動を示したことから、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼや GAD の活性も、両状態で同様の変化をしている可能性がある。

ニコチン退薬症候状態のバイオマーカーとして、クレアチンが検出された。クレアチンはエネルギー貯蔵や神経保護に関与するとされているが、クレアチンの周辺の代謝物である ATP やクレアチンリン酸の変動が不明であるため、クレアチンの変動に関しては今後詳細を検討していく必要がある。

結論

薬物誘発性のうつ病や自殺は、イギリス一国だけで、2000 件および 1000 件以上報告されており、社会的な問題であることは間違いない。うつ病誘発リスクのある薬物のスクリーニング手法に関する報告の多くは、神経伝達モノアミンであるセロトニンに注目している。しかしながら、セロトニンに注目し研究・開発された既存の抗うつ薬は、10-30%の患者でレスポンスを示さないことから。セロトニンの欠乏だけでうつ病を評価するには限界がある。そこで著者は、薬物誘発性うつ病の報告件数が第 1 位、および、薬物誘発性自殺の報告件数が第 2 位であるバレニクリンをモデル薬物として設定し、疾患の表現型を反映しやすいメタボローム解析に注目し、HR-MAS ^1H NMR spectroscopy を用いたメタボローム解析がうつ病様状態を評価可能かを検討し、バレニクリン使用中に発現するうつ病および自殺のリスク要因を探索することとした。

第 1 章では、FDA が公開しているパブリックデータベースである FAERS の日本語検索システムである CzeekV を用いて、バレニクリン使用症例の自殺関連事象発現リスクがどれほど高いか、および、バレニクリンの使用が精神疾患を増悪させるか、併用することで自殺関連事象発現リスクを低下させる抗うつ薬はなにかの 3 点について調査した。バレニクリン使用症例の自殺関連事象発現リスクは、抗うつ薬使用症例の 4 倍高く、バレニクリンの単独使用は自殺関連事象を誘発する可能性が示唆された。また、抗うつ薬によるうつ病治療をしている症例にバレニクリンを併用すると自殺関連事象リスクが上昇したことから、バレニクリンは基礎疾患として有している精神疾患の増悪を伴うという添付文書の結果を支持する知見が得られた。バレニクリン使用中に発現する自殺関連事象発現リスクを低下させる抗うつ薬は、三環系抗うつ薬の 1 つであるアミトリプ

チリンであり、逆に、併用することでリスクを増加させる抗うつ薬はミルタザピンであった。このように、第 1 章では、バレニクリンの使用はどれほど自殺関連事象リスクが高いか、および、リスクを低下させるための抗うつ薬としてアミトリプチリンが有用であることが示された。しかしながら、バレニクリン使用中に発現する自殺関連事象のリスク要因が、バレニクリンそのものにあるのか、あるいは、喫煙歴にあるのか、ニコチン退薬症候にあるのかまでは不明であった。

ある薬物にうつ病誘発リスクがあるか否かをメタボローム解析により評価するためには、“うつ (ポジティブコントロール)”と“非うつ (ネガティブコントロール)”の脳内代謝物プロファイルを判別可能であることや、“うつ”と“非うつ”とで、どのような代謝物に変動しているかを見出しておかなければならない。そこで第 2 章では、うつ病モデルラットの海馬組織を用いた脳内メタボローム解析が、“うつ”と“非うつ”を判別可能であるか、また、“うつ”と“非うつ”間で、どのような代謝物に変動しているかを調べた。慢性的なストレスを負荷されることにより作成されるうつ病モデルラットの中には、ストレスに対し抵抗性を示す *resilient* ラットと、ストレスに対し脆弱な *susceptible* ラットがおり、*susceptible* ラットは *anhedonia* が認められるだけでなく、*locomotor activity* も減少しており、よりうつ病の重症度が高いことが示唆された。脳内代謝物プロファイルの判別においては、対照ラットと *susceptible* ラットのプロファイルは明確に判別可能であり、対照ラットと *resilient* ラットの判別は困難であった。このことから、脳内代謝物プロファイルは、“うつ”と“非うつ”の判別だけでなく、*stress susceptibility* も反映可能であることが示唆された。脳内代謝物の変動については、N-アセチルアスパラギン酸や GABA が“うつ”と“非うつ”を判別するためのバイオマーカーになり得ることが示唆された。加えて、うつ病状態では、N-アセチルアスパラギン酸の生成に関わるアスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼ

や GABA の生成に関わる GAD のような酵素の活性が変化している可能性が示唆された。バイオマーカーの 1 つである N-アセチルアスパラギン酸は、対照群、resilient 群、susceptible 群の 3 群間すべてで有意に異なっていたため、“うつ”と“非うつ”の判別のマーカーになり得るだけでなく、stress susceptibility のマーカーになり得ることが見出された。

第 1 章において、バレニクリンを使用した症例では、自殺関連事象ないし neuropsychiatric event の発現リスクが高いことが示唆され、第 2 章において、脳内メタボローム解析が“うつ”と“非うつ”の判別に有用であることが示された。そこで第 3 章では、ラットにバレニクリンを投与することで、バレニクリンがうつ病様行動を呈するか、および、脳内代謝物プロファイルがうつ病モデルラットにどれほど類似するかを調べた。その結果、ラットの行動に影響を及ぼす要因はストレスのみであり、バレニクリンはラットの行動に影響しないことがわかった。また、バレニクリンとストレス間で統計学的交互作用が認められなかったことから、バレニクリンはうつ病様行動を増悪させないことが示唆された。脳内代謝物プロファイルについては、バレニクリンを投与されたラットは行動評価の結果を裏付けるように、対照ラットと類似したプロファイルを示した。また、バレニクリンとストレスの両方を負荷されたラットも対照ラットと同じようなプロファイルを示したことから、バレニクリンは抗うつ作用を持つ可能性が示唆された。したがって、第 3 章では、バレニクリンがうつ病を誘発・増悪させている可能性が低いことが示唆された。

FDA が公表しているバレニクリンの label によれば、バレニクリン使用中に発現する neuropsychiatric event の潜在的要因として、バレニクリンだけでなく、ニコチン退薬症候も挙げられている。もし、ニコチン退薬症候が主たる要因であるならば、neuropsychiatric event は、禁煙補助薬の種類に関わらず特定の期間に集

中して発現すると考え、第 4 章では禁煙補助薬ごとに自殺関連事象発現タイミングを調べた。FAERS 報告症例を解析した結果、3 種類の禁煙補助薬(バレニクリン、ブプロピオン、ニコチン製剤)の自殺関連事象発現タイミングは、使用開始後 3 週間以内に集中していることがわかった。ニコチン退薬症候は、禁煙開始後 2 日以内に出現し始め、1 週間以内にピークとなり、4 週間かけてベースラインまで戻ることが報告されているため、著者はバレニクリン使用中に発現する neuropsychiatric event の新たな要因としてニコチン退薬症候に注目することとした。

そこで第 5 章では、ニコチン退薬症候モデルラットおよび退薬症候回復モデルラットを作成し、メタボローム解析はニコチン退薬症候状態を判別可能であるか、および、ニコチン退薬症候状態で変動する代謝物はどれほどうつ病モデルラットに類似するかを調べた。その結果、ニコチンの最終投与から 12 時間の退薬期間を設けることにより、ニコチン退薬症候モデルラットを作成でき、脳内メタボローム解析はこれを明確に判別可能であった。18 時間の退薬期間を設けた退薬症候回復モデルラットにおいては、プロファイルは明確に判別可能であったものの、統計学的妥当性は不十分であった。ニコチン退薬症候状態の判別のマーカーとして、N-アセチルアスパラギン酸、GABA、クレアチン(重要度の大きい順)が示唆された。この 3 種類のマーカー代謝物のうち、N-アセチルアスパラギン酸と GABA は、うつ病状態の判別のマーカーとしても有用であることが第 2 章において示されており、ニコチン退薬症候状態とうつ病状態とで同様の変動をしていた。加えて、この 2 種類の代謝物の前駆体においても、両状態で同様の変動を示していたことから、ニコチン退薬症候状態とうつ病状態では、アスパラギン酸 N-アセチルトランスフェラーゼや GAD の活性が同じように変化している可能性がある。

以上、第 1 章から第 5 章までに得られた結果を総合的に解釈すると、バレニクリン使用中に発現する **neuropsychiatric event** は、ニコチン退薬症候が主たるリスク要因であり、バレニクリンは交絡要因である可能性が高いことが明らかとなった。ニコチン退薬症候が主たる要因であるという仮説は、**Anthenelli** らが実施した二重盲検無作為化比較試験から立証することが可能かもしれないが、**neuropsychiatric event** のような有害事象をアウトカムとした大規模臨床試験を実施することは困難であることから、別のアプローチによるエビデンスレベルの高い検証が必要であると考ええる。本学位論文では、パブリックな大規模臨床データベースを用いた薬剤疫学的研究と基礎研究を相互に橋渡しするトランスレーショナルリサーチを実施することにより、エビデンスレベルが高いとされる臨床研究と同等の研究結果を得ることが可能であった。加えて、メタボローム解析はうつ病やニコチン退薬症候に限らず、他の疾患や他の薬物にも応用可能であることから、今後益々発展する分野であると考えられる。

謝辞

本研究に臨み終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬剤作用解析学講座教授小林大介先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に当たり終始御指導と実験の御協力を賜りました城西大学薬学部薬剤作用解析学講座助教大島新司先生、同講座助手根岸彰生先生に深謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり有益な御指導、御助言を賜りました産業技術総合研究所根本直先生に心から感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり有益な御意見ならびに御激励を賜りました城西大学薬学部薬局管理学講座准教授大嶋繁先生、同講座准教授井上直子先生、城西大学薬学部教育支援室准教授沼尻幸彦先生、城西国際大学薬学部医療薬学教育研究センター助手大原厚祐先生、城西大学薬局冲田光良氏に感謝の意を表します。

さらに、本研究の実施に御支援、御協力を戴きました宮崎桃子学士、松本明日香学士、早川洋平学士、道山雄一学士、脇山春菜学士、石神賢氏、杉山智章氏、山城宏樹氏および城西大学薬学部薬剤作用解析学講座の諸氏に感謝いたします。

なお、本研究の一部は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の助成を受けたものである。

最後に、本研究において尊い命を捧げていただきました全てのラットに深く感謝し、哀悼の意を表します。

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による

1. Akimoto H, Oshima S, Negishi A, Ohara K, Ohshima S, Inoue N, Kobayashi D. Assessment of the Risk of Suicide-Related Events Induced by Concomitant Use of Antidepressants in Cases of Smoking Cessation Treatment with Varenicline and Assessment of Latent Risk by the Use of Varenicline. *PLoS One*. 2016; **11**(9): e0163583.
2. Akimoto H, Oshima S, Ohara K, Negishi A, Hiroyama H, Nemoto T, Kobayashi D. High-Resolution Magic-Angle Spinning-¹H-NMR Spectroscopy-Based Metabolic Profiling of Hippocampal Tissue in Rats with Depression-Like Symptoms. *Biol Pharm Bull*. 2017; **40**(6): 789-96.
3. Akimoto H, Wakiyama H, Oshima S, Negishi A, Ohara K, Numajiri S, Okita M, Ohshima S, Inoue N, Kobayashi D. Identification and Characteristics of Time-Related Shifts in Suicide-Related Event Frequency During Smoking Cessation Treatment with Varenicline. *Int J Med Sci*. 2017; **14**(10): 920-6.
4. Akimoto H, Oshima S, Michiyama Y, Negishi A, Nemoto T, Kobayashi D. Metabolic Profiling of the Hippocampus of Rats Experiencing Nicotine-Withdrawal Symptoms. *Biol Pharm Bull*. 2018; **41**(12): 1-7.
5. Akimoto H, Oshima S, Sugiyama T, Negishi A, Nemoto T, Kobayashi D. Changes in brain metabolites related to stress resilience: Metabolomic analysis of the hippocampus in a rat model of depression. *Behav Brain Res*. 2019; **359**: 342-52.

実験の部

第 1 章 実験の部

1. バレニクリン使用中に併用された抗うつ薬の自殺関連事象発現リスクの評価

1-1. 使用データベース

FDA が公開している有害事象自発報告システム(FAERS)の日本語検索システムである CzeekV を利用した。

1-2. 自殺関連事象の定義

ICH 国際医薬用語集日本語版 MedDRA/J では、自殺に関連する有害事象の SMQ 分類に、Preferred Term (PT) レベルで、自殺既遂(MedDRAcode 10010144)、自殺念慮(10042458)、自殺企図(10042464)、自殺行為(10065604)、自傷念慮(10051154)、自傷行動(10063495)、希死念慮を有するうつ病(10012397)、故意の自傷行為(10022524)、故意の中毒(10036000)、企図的過量投与(10022523)を含んでおり、それらをまとめて「自殺関連事象」と定義した。

1-3. 症例の抽出・背景マッチング

FAERS は、誰もが報告しやすいように自由記載の形をとっているため、誤入力データや重複データが含まれているという欠点がある。それらのデータを独自に整理し、日本語での検索を可能としたものとして CzeekV がある。CzeekV (version2.1.1) から、バレニクリンが使用された症例すべてを抽出し、抗うつ薬を 2 種類以上使用している症例を除外し、残った症例を析対象症例とした。次に、

選択バイアスを可能な限り取り除くために、患者の性別を予め階層化したうえで、Statistical Package for Social Science (SPSS, version 22)を用いて、Propensity Score (PS)による症例のマッチングを行った。PS 推定の際、患者背景である「年齢」、「体重」、「併用薬剤数」の3つを共変量とし、自殺関連事象の有無をアウトカムとした。PS の推定にはステップワイズ法による多重ロジスティック回帰分析を利用し、PS の距離(キャリパー値)は、「ロジット変換した PS 推定値の標準偏差を、0.25 倍したもの」とした。PS 推定値とキャリパー値を用いて、「自殺関連事象報告群(SRE+ group)」と「対照群(SRE- group)」とを1対1マッチングし、マッチングされたデータの共変量のバランスを評価するために Standardized Difference を算出した。なお、Standardized Difference は0.1未満でバランスが取れているとされる[114]。オッズ比算出までの手順を Figure 1 のフローチャートに示した。

1-4. Reporting Odds Ratio (ROR)と ROR 95%信頼区間(CI)の算出

マッチングされた症例を使って、「バレニクリン使用中に抗うつ薬を併用した症例群」(ADs+/VAR+ group)の自殺関連事象発現リスクを調べるために、抗うつ薬併用の有無を要因、自殺関連事象の有無をアウトカムとして、男女それぞれについて、ROR と ROR95%CI を算出した。また、男女それぞれの ROR を統合するために、Breslow-Day test を実施することで ROR の均一性を確認した後、Mantel-Haenszel method を用いて男女の ROR を統合し、統合 ROR(integrated ROR, iROR)を算出した。

2. 抗うつ薬使用中に併用されたバレニクリンの自殺関連事象発現リスクの評価

使用データベース、自殺関連衣装の定義は1.と同様である。抽出症例はバレニ

クリン使用症例ではなく、抗うつ薬を使用した症例すべてであり、それら症例を性別で階層化した後、**SRE+ group** と **SRE- group** に分け、年齢、体重、併用薬剤数の3つを共変量として、**SRE+ group** と **SRE- group** の1対1マッチングを実施した。**ROR** 算出の際、バレニクリン併用の有無を要因、自殺関連事象をアウトカムとした。以降は1.と同様の手順でリスク評価を行った。

第2章 実験の部

1. 実験動物

雄性 Wistar/ST ラット 7 週齢 39 匹を三共ラボサービス株式会社より購入し、使用した。39 匹のラットのうち、21 匹を stress group に、残りの 18 匹をストレスを負荷しない control group に無作為に割り当てた。ラットは室温摂氏 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間(7:00-19:00)の明暗サイクル、自由摂食(Lab MR Stock; Nosan Corp., Kanagawa, Japan)・摂水下で、少なくとも 1 週間馴化させた。

2. 慢性ストレスモデル(CMS model)ラットの作成

慢性的なストレス負荷は、既報に従って実施した[115]。ストレス負荷スケジュールを Figure 19 に示した。Stress group のラットに対し、長時間ストレッサー(>12 h)と短時間ストレッサー(≤ 1 h)を 1 種類ずつ組み合わせて、1 日 2 種類のストレスを 4 週間(Day 2–Day29)負荷した。長時間ストレッサーは、food and water deprivation (24 h), cage tilt (21 h, 45°), light during dark cycle (12 h), soiled cage (24 h), water deprivation (24 h; empty bottle(1 h)と組み合わせて実施)を含む。短時間ストレッサーは、foot shock (10min, 1.5mA, 15sec の stimulation と 60sec の interval を 8 回), forced swimming (5min, 4°C), tail pinching (1min), white noise (1h, 85dB, 15sec の stimulation と 15sec の interval を 120 回)を含む。

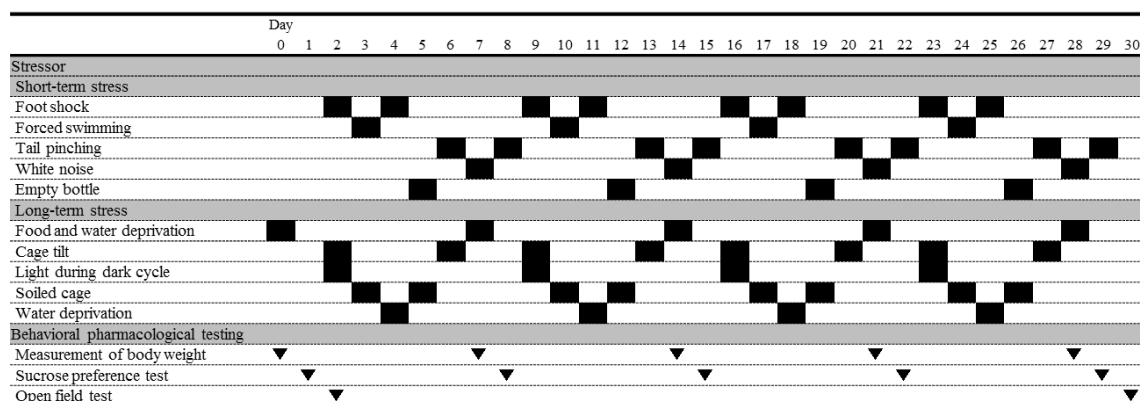


Figure 19. Stress loading schedule

Day 0 to Day 2 is the pre-experiment period. The stress loading period is from after implementation of the open field test (Day 2) to Day 29.

3. 行動評価

著者は、body weight measurement と 2 種類の行動評価(sucrose preference test, open field test)を実施した。詳細を次に示す。

(1) Body weight: Day 0 (pre-experiment)から 7 日間おき (Day 7, 14, 21, and 28)に、9:00 から 9:30 の間に、ラットの体重を計測した。

(2) Sucrose preference test: Day 1 (pre-experiment)から 7 日間おき (Day 8, 15, 22, and 29)に実施した[116]。スクロース溶液をラットに馴化させるためのトレーニングを、初回の sucrose preference test の 72 時間前に実施した: 1%スクロース溶液の入った給水ボトル 2 本を各ケージに静置し、24 時間後、片方のボトルを水に置換し、さらに 24 時間馴化させた。馴化後、ラットに対し 24 時間の food and water deprivation を実施した後、24 時間の sucrose preference test を実施した(Day 1)。Sucrose preference は、24 時間の 1%スクロース溶液摂取量と、1%スクロース溶液と水の合計摂取量の 100 分率とした。

Pre-experiment の段階で、ストレス負荷後に見られるような行動を示す動物は、ストレス負荷に対して異なるレスポンスを示すことが示唆されている[63]。そこ

で本研究では、うつ病の中核症状である anhedonia の指標である sucrose preference を、stress group と control group 間で揃えるために、Pre-experiment における sucrose preference が 80.0%未満であったラットは実験から除外した。

ストレスに対し、susceptible であるか、あるいは、resilient であるかを判別するために、sucrose preference 値が利用されている[48,49]。4 週間のストレス負荷終了後、Stress group のラットのうち、Day 29 における sucrose preference が 65.0%未満であったラットは susceptible group に、残りの stress group のラットのうち、pre-experiment からの変化が 10.0%未満であったラットは resilient group に分類された。

(3) Open field test: Open field test は、静かな環境下でラットを自由に行動させる試験である。我々は、既報に従い、Day 2 (pre-experiment)と Day 30 に open field test を実施した[117]。装置として、パールグレー色の床にグレー色のラインで 25 分割した 100 cm × 100 cm × 40 cm のプラスチックケージを用いた。1 匹のラットを中央に静かに置いて、格子を横切った回数ならびに後ろ足で立ち上がる回数を 6 分間ビデオで記録した。test 終了後に装置を水および消毒用エタノールで清拭し乾燥させた。ラット 1 匹の test 終了後に、装置の清掃を毎回実施した。6 分間の動画の最初の 1 分間を除いた 5 分間における区間横切り回数 (crossing)、後ろ脚起ち回数(rearing)、排便回数(defecation)、ならびに毛繕い時間 (grooming)を評価した[118,119]。

4. サンプル調製

最後の open field test 終了後、ペントバルビタールナトリウム(50mg / kg)麻醉下でラットを断頭した。脳組織を素早く摘出した後、大脳縦列に沿って右脳と左脳に分けた。右脳と左脳それぞれの海馬を分画し、液体窒素を用いて急速冷凍し

た後、測定日まで-80 °C で保管した。脳内代謝物の死後の変化を一定にするために、この一連の作業を 10 から 15 分以内に終えるようにした。

5. 海馬の mature BDNF の測定

冷凍保存されていた左脳の海馬を氷冷下で融解させ、テフロン製ホモジナイザーに入れ、10 mg wet weight 当たり、100 μ L の ice-cold RIPA buffer containing 25mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 μ M bestatin, 10 μ M pepstatin A, 20 μ M leupeptin hemisulfate, 0.8 μ M aprotinin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 2mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)を添加した。氷冷下、200 rpm で 5 分間ホモジナイズし、ホモジネートを 4 °C, 14,000 \times g, 30 min の条件で遠心後、上清を回収した。上清を ice-cold RIPA buffer で 500 倍希釈した後、添付されていた説明書に従って、Mature BDNF, Human/Mouse/Rat, Rapid ELISA Kit (Biosensis Pty Ltd., Australia)を用いて海馬組織中の mature BDNF を定量した。

海馬組織中のタンパク質はビシンコニン酸(BCA)アッセイキットを使用して定量した(BCA protein assay kit-reducing agent compatible, Thermo Scientific, MA, USA)。

6. NMR スペクトルの計測

著者は FASTNANOTMprobehead を備え付けた Varian 製 699.7MHz ¹H NMR 分析機器 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用して NMR スペクトルを計測した。右脳の海馬組織 (wet weight 10-20mg) に 2.5mM sodium-3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-d 6-sulfonate (DSS-d6)含有 D₂O 43 μ L を添加した。次に、ポリプロピレン製のペッスルで 20 回転手動でサンプルをホモジナイ

ズした。ホモジネートすべてを 43- μ L glass cell に充填し、glass cell を外径 4mm の酸化ジルコニウムローターにセットした。ローターを NMR spectrometer にセットした。

NMR spectrometer のパラメーターを次の通りに設定した: 90° パルス幅 7.50-7.75 μ s (サンプル毎に測定し設定した); 緩和時間 2.000 s; データポイント数 32k complex; 観測幅 8389.3 Hz; 積算回数 128 回; 回転速度 5000Hz. NMR スペクトル中の水由来のシグナルを低減させるために pre-saturation sequence を実施した。さらに、タンパク質のような高分子由来の broad signals を低減し、その後の解析を低分子で行うために、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulse sequence を利用して NMR スペクトルを計測した ([D-90°-(180°)-n-FID, where FID is free induction decay] with a fixed spin-spin relaxation delay, 2 τ of 60 ms (τ =400 μ s)). 我々は、測定中のサンプル間の代謝物変動を一定に保つことに注意し、測定温度を 298 K に保った[115]。この操作は VnmrJ software (Ver 4.0; Agilent Technologies) で実施した。

7. NMR スペクトルの処理

計測した自由誘導減衰(FID)をフーリエ変換した後、VnmrJ software を用いて、手動でベースライン補正および位相補正を実施した。NMR スペクトルへの代謝物の割り当ては、Chenomx NMR suite (Ver. 8.1, Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada)を利用、もしくは、既存の文献を参考に実施した[120,121]。

NMR スペクトルを多変量解析に供するために、計測したすべての FID に対し、Alice2 for the Metaoblome software (Ver. 2; JEOL, Tokyo, Japan)を用いて 32K にゼロフィルし、絶対値微分をした後、フーリエ変換を行った。計測された NMR スペクトルの 0.20 – 10.00ppm の化学シフトの範囲を 0.04ppm の間隔(bucket)で積分

し、239 の変数を得た。ただし、4.60–4.92 ppm の範囲は水分子のシグナルであるため、この領域を除外した全 bucket の和が 100 になるように各 bucket を標準化した。

8. 統計解析

Control group と stress group の 2 群間での、行動評価の結果や海馬組織中の BDNF 量を比較するために、two-tailed student's *t*-test を実施した。Control group, resilient group, susceptible group の 3 群間で比較する場合は、ANOVA を実施した後、Tukey-Kramer 法による多重比較を実施した。また、著者は NMR スペクトルの各 bucket を student's *t*-test にかけることで、各脳内代謝物の相対的変動を調べた。Two-tailed student's *t*-test、ANOVA、Tukey-Kramer 法による多重比較を実施するために、R software (version 3.2.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) for Windows®を使用した。

脳内代謝物プロファイルの違いを見出すために、the multivariate analysis software SIMCA-P (version 13.0.3, Umetrics, Umea, Sweden)を用いて、partial least square discriminant analysis (PLS-DA)を実施した。また、PLS-DA model へのオーバーフィッティングを避けるために、100 回の iteration で、permutation test を実施した[64]。

第3章 実験の部

1. 実験動物

第2章 1. と同様の実験動物 24 匹を同環境下で飼育した。24 匹のラットを次に示す 4 つのグループに群分けした(各群 $n = 6$): ストレスおよびバレニクリンを負荷しない VAR (-) / non-stress group (control group); ストレスのみを負荷する VAR (-) / stress group (depression group); バレニクリンのみを負荷する VAR (+) / non-stress group; ストレスおよびバレニクリンを負荷する VAR (+) / stress group.

2. ストレス負荷

VAR (-) / stress group (depression group)と VAR (+) / stress group に対し、慢性的にストレスを負荷した。ストレス負荷の方法は第2章 2. に準ずる。ただし、ストレス負荷期間は3週間とした。

3. バレニクリンの慢性的経口投与

VAR (+) / non-stress group および VAR (+) / stress group に対し、varenicline tartrate (Sigma-Aldrich, USA) 1.0 mg / kg body weight を、ストレス負荷期間と重なるように3週間連日経口投与した。

4. 行動評価

第2章 3. に準ずる。

5. サンプル調製

最後の open field test 終了後、ジエチルエーテル麻酔下でラットを断頭した。

脳組織を素早く摘出した後、大脳縦列に沿って右脳と左脳に分けた。右脳の海馬を分画し、右脳の海馬および左脳を液体窒素を用いて急速冷凍した後、測定日まで-45℃で保管した。脳内代謝物の死後の変化を一定にするために、この一連の作業を10から15分以内に終えるようにした。

6. 脳中バレニクリン濃度の定量

冷凍保存された左脳組織を氷冷下で融解させた後、20mM phosphate buffer (pH7.40) 3.0 mL/g brain を添加し、テフロン製ホモジナイザーを用いて、氷冷下、200rpm, 5min の条件でホモジナイズした。ホモジネート 500 μ L に対し、50 μ g/mL 2,3,4,5-tetrahydro-3-(trifluoroacetyl)-1,5-methano-1H-3-benzazepine-7,8-diamine (internal standard; Toronto Research Chemicals, Canada) 150 μ L を添加した。続いて、5M HClO₄ 200 μ L を添加し、除タンパク後、ホモジネートを 4℃, 15,000 \times g, 10 min の条件で遠心分離した。上清 600 μ L を回収した後、8.5% H₃PO₄ 500 μ L を添加し、全量を 1100 μ L とした。この水溶液を Oasis[®] MCX 10 mg / 1 cc 固相抽出カートリッジを用いて濃縮した。濃縮手順を次に示した。

- (1) コンディショニング: メタノール 1.0 mL を通液させた
- (2) 平衡化: 蒸留水 1.0 mL を通液させた
- (3) 保持: 試料溶液 1.0 mL を通液させた
- (4) 洗浄: 2%ギ酸水溶液 1.0 mL を通液させ、続いて acetonitrile 1.0 mL を通液させた
- (5) 脱離: acetonitrile / 25% ammonium hydroxide (90:10, v/v) 1.0 mL を2回通液させた後、acetonitrile 1.0 mL を通液させた
- (6) 濃縮(窒素気流化乾固): 45℃で加温しながら、脱離溶液 3.0 mL を窒素気流下で乾固・濃縮した

(7) 再構築: HPLC の移動相(後述) 100 μ L で再構築した

HPLC でバレニクリンを定量するために、移動相(50mM NaH₂PO₄ (pH3.00) : acetonitrile = 9 : 1)を流速 1.0mL / min で流し、固定相は Atlantis dC18 (250 \times 4.6 mm, particle size 5 μ m)を用いた。検出波長は 235 nM とし、カラム温度および検出器温度は 45 $^{\circ}$ C として、バレニクリンの脳中濃度を測定した[122,123]。

7. NMR スペクトルの計測

試料サンプルの NMR spectrometer への装填までは第 2 章 6. に準ずる。

NMR spectrometer のパラメーターを次の通りに設定した: 90 $^{\circ}$ パルス幅 7.80-8.00 μ s (サンプル毎に測定し設定した); 緩和時間 2.000 s; データポイント数 32k complex; 観測幅 8389.3 Hz; 積算回数 128 回; 回転速度 5000Hz. NMR スペクトル中の水由来のシグナルを低減させるために pre-saturation sequence を実施した。我々は、測定中のサンプル間の代謝物変動を一定に保つことに注意し、測定温度を 298 K に保った[115]。この操作は VnmrJ software (Ver 4.0; Agilent Technologies)で実施した。

8. NMR スペクトルの処理

計測した NMR スペクトルを積分するまでの手順は第 2 章 7. に準ずる。ただし、第 3 章では、4.70–4.90 ppm の範囲を水分子由来のシグナルであるとし、この領域を除外した全 bucket の和が 100 になるように各 bucket を標準化した。

9. 統計解析

全 4 群間での行動評価の結果の比較は two-way ANOVA により実施した。統計解析ソフトは R software (version 3.2.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna,

Austria) for Windows[®]を使用した。

脳内代謝物プロファイルの違いを見出すために、the multivariate analysis software SIMCA-P (version 13.0.3, Umetrics, Umea, Sweden)を用いて、多段階主成分分析(multi-step PCA)を実施した。Multi-step PCA の手順として、まず、すべての変数を対象として PCA を実施し、control group と depression group のプロファイルを判別できなかった。その後、control group と depression group の判別を困難にしている(特徴空間を歪ませている)変数を削除しながら PCA を段階的に実施した。

第4章 実験の部

1. バレニクリン使用症例における自殺関連事象発現タイミングの解析

1-1. 使用データベース

FDA が公開している 2004 年第 1 期から 2016 年第 1 期までの FAERS Quarterly Data Files を使用した。Quarterly Data Files は DEMO, DRUG, REAC, OUTC, RPSR, THER, and INDI の 7 種類のデータセットから構成されており、著者は DEMO, DRUG, REAC, and THER の 4 種類のデータセットを解析に使用した。

1-2. 自殺関連事象の定義

The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA, version 19.1)を使用し、preferred term (PT)レベルで以下の用語を自殺関連事象と定義した: completed suicide (MedDRA code 10010144), suicidal ideation (10042458), suicide attempt (10042464), suicidal behaviour (10065604), self-injurious ideation (10051154), self-injurious behaviour (10063495), depression suicidal (10012397), intentional self-injury (10022524), poisoning deliberate (10036000), intentional overdose (10022523), and suicide threat (10077417).

1-3. 症例の抽出

著者は、Quarterly Data Files から、バレニクリンを使用し、かつ、自殺関連事象を報告した症例(SRE+ / VAR+症例)のみを抽出した。

1-4. 自殺関連事象発現日数の算出

SRE+ / VAR+症例のバレニクリン使用開始日(START_DT)と自殺関連事象発現

日(EVENT_DT)の差を算出し、その差を自殺関連事象発現日数とした。

1-5. 自殺のリスクが知られている併存症による影響の除外

うつ病や統合失調症のような精神疾患は自殺のリスク要因であることが知られている[124,125]。そこで著者は、そのような疾患に罹患した症例を解析から除外するために、SRE+/VAR+症例から、抗うつ薬や抗精神病薬を併用している症例を解析から除外した。

1-6. 重複症例の削除

重複症例の削除は、既報の文献を参考として実施した[126]。DEMO ファイルに報告されたすべての項目が重複していた症例は除外し、次に、報告された症例の ID に相当する“CASE ID”以外のすべての項目で重複していた症例も除外した。

1-7. ヒストグラムの作成と喫煙歴がおよぼす自殺関連事象への影響の除外

重複症例を削除した後、バレニクリンの使用を開始してから 1 週間毎の自殺関連事象報告症例数のヒストグラムを作成した。しかしながら、ヒストグラムを作成しただけでは、ヒストグラムにベースラインを引くことができず、バレニクリンによる禁煙治療に起因する自殺関連事象発現タイミングは検討できない。なぜなら、自殺関連事象の発現に影響を与える因子として、喫煙歴が挙げられるからである[102]。

SRE+/VAR+症例の自殺関連事象発現日数は、大部分の症例で 0 日以上、すなわち、EVENT_DT と START_DT の差が 0 日以上であるが、一部の症例においては 0 日未満である。0 日未満の症例とは、バレニクリン使用開始前(禁煙治療開

始前)に自殺関連事象を報告した症例のことであり、喫煙中に自殺関連事象を報告したことになる。したがって、著者は0日未満の症例を用いれば、上述した喫煙歴による影響を取り除けると考えた。

そこで、著者は、X-bar chart の概念を参考に[101]、ヒストグラムから喫煙歴による影響を除去することを試みた。まず、ヒストグラム中の0日未満の症例(Week -4 から Week -1 まで)の自殺関連事象報告症例数の mean と SD を算出した。次に、 $\text{mean} + 3.0 \times \text{SD}$ を算出し、この値を喫煙歴が影響を及ぼしうる限界の値とし、ヒストグラムにベースラインを引いた。Week 1(バレニクリンの使用を開始した週)以降の週において、自殺関連事象報告症例数がベースラインを上回った週をバレニクリンによる禁煙治療が自殺関連事象の発現に影響を与えている週とした。

2. ブプロピオンおよびニコチン製剤使用症例における自殺関連事象発現タイミングの解析

バレニクリン使用症例の解析手順に準じて実施した。ただし、ブプロピオンには抗うつ薬としての適応もあるため、禁煙補助薬として使用される商品名(Zyban[®])に限定して解析を実施した。また、ニコチン製剤については、パッチ剤やガム等様々な剤形が存在するが、それらを区別することなく解析に供した。

第5章 実験の部

1. 実験動物

第2章 1. および第3章 1. と同様の実験動物 24 匹を同環境下で飼育した。

2. ニコチン退薬症候モデルラットの作成

2-1. ニコチンの慢性皮下投与

Epping らの報告を含むいくつかの文献を参考に、ニコチンの投与量、投与経路、ニコチン退薬期間等の条件を決定した[109,110,127]。ニコチン退薬症候モデルラットを作成するために、Nicotine Bi-L-(+)-tartrate Dihydrate (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) 0.75mg (as nicotine) / kg body weight を 1 日 4 回(10:30, 14:00, 17:30, 21:00) 14 日間連日皮下投与した(Day 1 – Day 14)。ニコチンの最終投与から 12 時間の退薬期間を設けた群を Nic_12 group、18 時間の退薬期間を設けた群を Nic_18 group とした。また、ニコチンの代わりに生理食塩液を投与し、退薬期間を設けた群をそれぞれ、Sal_12 group および Sal_18 group とした(各群 n= 6)。

2-2. 行動評価

行動評価の評価項目は、body weight, food intake, open field test とした。

(1) Weight gain: 実験開始前である Day 0 (pre-experiment)と、ニコチン反復投与期間中である Day 7 および Day 14 においてラットの体重を測定した。

(2) Food intake: ニコチン反復投与期間中である Day 2, 5, 9, and 12 において、24 時間の摂餌量(g)を計測した。

(3) Open field test: 第2章 3. に準ずる。

3. サンプル調製

最後の open field test 終了後、ジエチルエーテル麻酔下でラットを断頭した。脳組織を素早く摘出した後、大脳縦列に沿って右脳と左脳に分けた。右脳の海馬を分画し、右脳の海馬および左脳を液体窒素を用いて急速冷凍した後、測定日まで-45 °C で保管した。脳内代謝物の死後の変化を一定にするために、この一連の作業を 10 から 15 分以内に終えるようにした。

4. NMR スペクトルの計測

第 3 章 7. に準ずる。

5. NMR スペクトルの処理

第 3 章 8. に準ずる。

6. 統計解析

著者は NMR スペクトルの各 bucket を two-tailed student's *t*-test にかけることで、各脳内代謝物の相対的変動を調べた。統計解析ソフトとして、R software (version 3.2.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) for Windows® を使用した。

脳内代謝物プロファイルの違いを見出すために、the multivariate analysis software SIMCA-P (version 13.0.3, Umetrics, Umea, Sweden)を用いて、partial least square discriminant analysis (PLS-DA)を実施した。また、PLS-DA model へのオーバーフィッティングを避けるために、100 回の iteration で、permutation test を実施した[64]。

引用文献

- 1) World Health Organization. Fact sheets. Depression. <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>
- 2) Stewart WF, Ricci JA, Chee E, Hahn SR, Morganstein D. Cost of lost productive work time among US workers with depression. *JAMA*. 2003; 289(23): 3135-44.
- 3) Okumura Y, Higuchi T. Cost of depression among adults in Japan. *Prim Care Companion CNS Disord*. 2011;13(3).
- 4) Evans-Lacko S, Knapp M. Importance of social and cultural factors for attitudes, disclosure and time off work for depression: findings from a seven country European study on depression in the workplace. *PLoS One*. 2014; 9(3): e91053.
- 5) Thomas KH, Martin RM, Potokar J, Pirmohamed M, Gunnell D. Reporting of drug induced depression and fatal and non-fatal suicidal behaviour in the UK from 1998 to 2011. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2014; 15: 54.
- 6) Le Noury J, Nardo JM, Healy D, Jureidini J, Raven M, Tufanaru C, Abi-Jaoude E. Restoring Study 329: efficacy and harms of paroxetine and imipramine in treatment of major depression in adolescence. *BMJ*. 2015; 351: h4320.
- 7) Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, Azoulay S, Watsky EJ, Williams KE, Billing CB, Gong J, Reeves KR; Varenicline Phase 3 Study Group. Efficacy of varenicline, an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Jul 5;296(1):56-63.
- 8) U.S. Food and Drug administration. Public Health Advisory: FDA Requires New Boxed Warnings for the Smoking Cessation Drugs Chantix and Zyban. <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm169988.htm>>
- 9) Jarlenski M, Hyon Baik S, Zhang Y. Trends in Use of Medications for Smoking Cessation in Medicare, 2007-2012. *Am J Prev Med*. 2016; 51(3): 301-8.
- 10) Anthenelli RM, Benowitz NL, West R, St Aubin L, McRae T, Lawrence D, Ascher J, Russ C, Krishen A, Evins AE. Neuropsychiatric safety and efficacy of varenicline, bupropion, and nicotine patch in smokers with and without psychiatric disorders (EAGLES): a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*. 2016; 387(10037): 2507-20.
- 11) Kotz D, Viechtbauer W, Simpson CR, van Schayck OCP, West R, Sheikh A. Cardiovascular and neuropsychiatric risks of varenicline and bupropion in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2017; 72(10): 905-11.

- 12) Cavarec L, Vincent L, Le Borgne C, Plusquellec C, Ollivier N, Normandie-Levi P, Allemand F, Salvétat N, Mathieu-Dupas E, Molina F, Weissmann D, Pujol JF. In vitro screening for drug-induced depression and/or suicidal adverse effects: a new toxicogenomic assay based on CE-SSCP analysis of HTR2C mRNA editing in SH-SY5Y cells. *Neurotox Res.* 2013; 23(1): 49-62.
- 13) Antkiewicz-Michaluk L, Wąsik A, Możdżeń E, Romańska I, Michaluk J. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat. *Neurotox Res.* 2014; 26(1): 85-98.
- 14) Xue R, He XH, Yuan L, Chen HX, Zhang LM, Yong Z, Yu G, Fan SY, Li YF, Zhong BH, Zhang YZ. Effects of 071031B, a novel serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, on monoamine system in mice and rats. *J Pharmacol Sci.* 2016; 130(1): 1-7.
- 15) Fischer CW, Eskelund A, Budac DP, Tillmann S, Liebenberg N, Elfving B, Wegener G. Interferon-alpha treatment induces depression-like behaviour accompanied by elevated hippocampal quinolinic acid levels in rats. *Behav Brain Res.* 2015; 293: 166-72.
- 16) Fahey B, Hickey B, Kelleher D, O'Dwyer AM, O'Mara SM. The widely-used antiviral drug interferon-alpha induces depressive- and anxiogenic-like effects in healthy rats. *Behav Brain Res.* 2007; 182(1): 80-7.
- 17) Al-Harbi KS. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence.* 2012; 6: 369-88.
- 18) 福崎英一郎. メタボロミクスの先端技術と応用 (popular edition). 2013.
- 19) Wu H, Wang P, Liu M, Tang L, Fang J, Zhao Y, Zhang Y, Li D, Xu H, Yang H. A ¹H-NMR-Based Metabonomic Study on the Anti-Depressive Effect of the Total Alkaloid of *Corydalis Rhizoma*. *Molecules.* 2015 May 29;20(6):10047-64.
- 20) Tian JS, Liu CC, Xiang H, Zheng XF, Peng GJ, Zhang X, Du GH, Qin XM. Investigation on the antidepressant effect of sea buckthorn seed oil through the GC-MS-based metabolomics approach coupled with multivariate analysis. *Food Funct.* 2015; 6(11): 3585-92.
- 21) Sugiyama Y. Importance of Reverse Translational Research. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2017; 137(6): 673-9.
- 22) Floyd JS, Kaspera R, Marcianti KD, Weiss NS, Heckbert SR, Lumley T, Wiggins KL, Tamraz B, Kwok PY, Totah RA, Psaty BM. A screening study of drug-drug interactions in cerivastatin users: an adverse effect of clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 91(5): 896-904.

- 23) World Health Organization. Fact sheets. Tobacco. <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>>
- 24) Institute for Economics and Policy. A study on the role of non-smoking policy. <http://www.ihep.jp/publications/report/search.php?dl=26&i=1>.
- 25) Xu X, Bishop EE, Kennedy SM, Simpson SA, Pechacek TF. Annual healthcare spending attributable to cigarette smoking: an update. *Am J Prev Med*. 2015; 48(3): 326-33.
- 26) Hays JT, Ebbert JO, Sood A. Treating tobacco dependence in light of the 2008 US Department of Health and Human Services clinical practice guideline. *Mayo Clin Proc*. 2009; 84(8): 730-5.
- 27) Aubin HJ, Bobak A, Britton JR, Oncken C, Billing CB Jr, Gong J, Williams KE, Reeves KR. Varenicline versus transdermal nicotine patch for smoking cessation: results from a randomised open-label trial. *Thorax*. 2008; 63(8): 717-24.
- 28) Thomas KH, Martin RM, Knipe DW, Higgins JP, Gunnell D. Risk of neuropsychiatric adverse events associated with varenicline: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2015; 350: h1109.
- 29) Breslau N, Kilbey MM, Andreski P. Nicotine dependence and major depression. New evidence from a prospective investigation. *Arch Gen Psychiatry*. 1993; 50(1): 31-5.
- 30) Zvolensky MJ, Bakhshaie J, Sheffer C, Perez A, Goodwin RD. Major depressive disorder and smoking relapse among adults in the United States: a 10-year, prospective investigation. *Psychiatry Res*. 2015; 226(1): 73-7.
- 31) Health & Social Care Information Centre. Prescription Cost Analysis, England – 2014. <<https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/prescription-cost-analysis/prescription-cost-analysis-england-2014>>
- 32) Jick H, Kaye JA, Jick SS. Antidepressants and the risk of suicidal behaviors. *JAMA*. 2004; 292(3): 338-43.
- 33) Martinez C, Rietbrock S, Wise L, Ashby D, Chick J, Moseley J, Evans S, Gunnell D. Antidepressant treatment and the risk of fatal and non-fatal self harm in first episode depression: nested case-control study. *BMJ*. 2005; 330(7488): 389.
- 34) Stone M, Laughren T, Jones ML, Levenson M, Holland PC, Hughes A, Hammad TA, Temple R, Rochester G. Risk of suicidality in clinical trials of antidepressants in adults: analysis of proprietary data submitted to US Food and Drug Administration. *BMJ*. 2009; 339: b2880.
- 35) Gibbons RD, Brown CH, Hur K, Marcus SM, Bhaumik DK, Erkens JA, Herings

- RM, Mann JJ. Early evidence on the effects of regulators' suicidality warnings on SSRI prescriptions and suicide in children and adolescents. *Am J Psychiatry*. 2007; 164(9): 1356-63.
- 36) Nakagawa A, Grunebaum MF, Ellis SP, Oquendo MA, Kashima H, Gibbons RD, Mann JJ. Association of suicide and antidepressant prescription rates in Japan, 1999-2003. *J Clin Psychiatry*. 2007; 68(6): 908-16.
- 37) 野村総一郎. 抗うつ薬による自殺と攻撃性増強についての論考. *医学の歩み*. 2009; 231(10): 1004-8.
- 38) Coupland C, Hill T, Morriss R, Arthur A, Moore M, Hippisley-Cox J. Antidepressant use and risk of suicide and attempted suicide or self harm in people aged 20 to 64: cohort study using a primary care database. *BMJ*. 2015; 350: h517.
- 39) Castelpietra G, Gobbato M, Valent F, De Vido C, Balestrieri M, Isacson G. Antidepressant use in suicides: a case-control study from the Friuli Venezia Giulia Region, Italy, 2005-2014. *Eur J Clin Pharmacol*. 2017; 73: 883-90.
- 40) Kennedy SH. Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues Clin Neurosci*. 2008; 10(3): 271-7.
- 41) Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 1999; 156(6): 837-41.
- 42) Luthar SS, Cicchetti D, Becker B. The construct of resilience: a critical evaluation and guidelines for future work. *Child Dev*. 2000; 71(3): 543-62.
- 43) Wu G, Feder A, Cohen H, Kim JJ, Calderon S, Charney DS, Mathé AA. Understanding resilience. *Front Behav Neurosci*. 2013; 7: 10.
- 44) Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997; 134(4): 319-29.
- 45) Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987; 93(3): 358-64.
- 46) Cryan JF, Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*. 2004; 9(4): 326-57.
- 47) Raya J, Girardi CEN, Esumi LA, Ferreira LBT, Hipólido DC. Multiple trial inhibitory avoidance acquisition and retrieval are resistant to chronic stress. *Behav Processes*. 2017; 147: 28-32.
- 48) Remus JL, Stewart LT, Camp RM, Novak CM, Johnson JD. Interaction of

- metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference. *Behav Neurosci.* 2015; 129(3): 321-30.
- 49) Shao WH, Fan SH, Lei Y, Yao GE, Chen JJ, Zhou J, Xu HB, Liu HP, Wu B, Zheng P, Fang L, Xie P. Metabolomic identification of molecular changes associated with stress resilience in the chronic mild stress rat model of depression. *Metabolomics.* 2013; 9: 433-43.
 - 50) Jama A, Cecchi M, Calvo N, Watson SJ, Akil H. Inter-individual differences in novelty-seeking behavior in rats predict differential responses to desipramine in the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl).* 2008; 198(3): 333-40.
 - 51) Mendrek A, Monterosso J, Simon SL, Jarvik M, Brody A, Olmstead R, Domier CP, Cohen MS, Ernst M, London ED. Working memory in cigarette smokers: comparison to non-smokers and effects of abstinence. *Addict Behav.* 2006; 31(5): 833-44.
 - 52) Jacobsen LK, Krystal JH, Mennel WE, Westerveld M, Frost SJ, Pugh KR. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biol Psychiatry.* 2005; 57(1): 56-66.
 - 53) Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics.* 2012; 75(4): 1079-88.
 - 54) McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 105-22.
 - 55) McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry.* 2000; 48(8): 721-31.
 - 56) Yu H, Chen ZY. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin.* 2011; 32(1): 3-11.
 - 57) Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Repérant C, Guilloux JP, Coudoré F, Hen R, Gardier AM. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology.* 2008; 55(6): 1006-14.
 - 58) Deltheil T, Tanaka K, Reperant C, Hen R, David DJ, Gardier AM. Synergistic neurochemical and behavioural effects of acute intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor and antidepressants in adult mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009; 12(7): 905-15.
 - 59) Chen XQ, Li CF, Chen SJ, Liang WN, Wang M, Wang SS, Dong SQ, Yi LT, Li CD. The antidepressant-like effects of Chaihu Shugan San: Dependent on the hippocampal BDNF-TrkB-ERK/Akt signaling activation in perimenopausal depression-like rats. *Biomed Pharmacother.* 2018; 105: 45-52.

- 60) Lu Y, Ho CS, McIntyre RS, Wang W, Ho RC. Effects of vortioxetine and fluoxetine on the level of Brain Derived Neurotrophic Factors (BDNF) in the hippocampus of chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. *Brain Res Bull.* 2018; 142: 1-7.
- 61) Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res.* 1998; 58(9): 1825-32.
- 62) Barton SJ, Howe FA, Tomlins AM, Cudlip SA, Nicholson JK, Bell BA, Griffiths JR. Comparison of in vivo ¹H MRS of human brain tumours with ¹H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. *MAGMA.* 1999; 8(2): 121-8.
- 63) Duclot F, Hollis F, Darcy MJ, Kabbaj M. Individual differences in novelty-seeking behavior in rats as a model for psychosocial stress-related mood disorders. *Physiol Behav.* 2011; 104(2): 296-305.
- 64) Ke C, Li A, Hou Y, Sun M, Yang K, Cheng J, Wang J, Ge T, Zhang F, Li Q, Li J, Wu Y, Lou G, Li K. Metabolic phenotyping for monitoring ovarian cancer patients. *Sci Rep.* 2016; 6: 23334.
- 65) Li H, Chen B, Shao X, Hu Z, Deng Y, Zhu R, Li Y, Zhang B, Hou J, Du C, Zhao Q, Fu D, Bu Q, Zhao Y, Cen X. ¹H-Nuclear magnetic resonance-based metabolomic analysis of brain in mice with nicotine treatment. *BMC Neurosci.* 2014; 15: 32.
- 66) Sun M, Gao X, Zhang D, Ke C, Hou Y, Fan L, Zhang R, Liu H, Li K, Yu B. Identification of biomarkers for unstable angina by plasma metabolomic profiling. *Mol Biosyst.* 2013; 9(12): 3059-67.
- 67) Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001; 276(16): 12660-6.
- 68) Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010; 70(5): 304-22.
- 69) Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem.* 2008; 89(3): 312-23.
- 70) Stratmann M, Konrad C, Kugel H, Krug A, Schöning S, Ohrmann P, Uhlmann C, Postert C, Suslow T, Heindel W, Arolt V, Kircher T, Dannlowski U. Insular and hippocampal gray matter volume reductions in patients with major depressive disorder. *PLoS One.* 2014; 9(7): e102692.
- 71) Frodl T, Schüle C, Schmitt G, Born C, Baghai T, Zill P, Bottlender R, Rupprecht R, Bondy B, Reiser M, Möller HJ, Meisenzahl EM. Association of the brain-derived

- neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64(4): 410-6.
- 72) Sheldrick A, Camara S, Ilieva M, Riederer P, Michel TM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals - a proof of concept study. *Eur Psychiatry*. 2017; 46: 65-71.
 - 73) Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007; 85(3): 525-35.
 - 74) Ieraci A, Mallei A, Popoli M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast*. 2016; 2016: 6212983.
 - 75) Lu Y, Ho CS, McIntyre RS, Wang W, Ho RC. Effects of vortioxetine and fluoxetine on the level of Brain Derived Neurotrophic Factors (BDNF) in the hippocampus of chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. *Brain Res Bull*. 2018; 142: 1-7.
 - 76) Wang JM, Pei LX, Zhang YY, Cheng YX, Niu CL, Cui Y, Feng WS, Wang GF. Ethanol extract of *Rehmannia glutinosa* exerts antidepressant-like effects on a rat chronic unpredictable mild stress model by involving monoamines and BDNF. *Metab Brain Dis*. 2018; 33(3): 885-892.
 - 77) Mu RH, Fang XY, Wang SS, Li CF, Chen SM, Chen XM, Liu Q, Li YC, Yi LT. Antidepressant-like effects of standardized gypenosides: involvement of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233(17): 3211-21.
 - 78) Stepanichev M, Manolova A, Peregud D, Onufriev M, Freiman S, Aniol V, Moiseeva Y, Novikova M, Lazareva N, Gulyaeva N. Specific Activity Features in the Forced Swim Test: Brain Neurotrophins and Development of Stress-induced Depressive-like Behavior in Rats. *Neuroscience*. 2018; 375: 49-61.
 - 79) Zhang Y, Yuan S, Pu J, Yang L, Zhou X, Liu L, Jiang X, Zhang H, Teng T, Tian L, Xie P. Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis of Hippocampus in a Rat Model of Depression. *Neuroscience*. 2018; 371: 207-220.
 - 80) Du H, Wang K, Su L, Zhao H, Gao S, Lin Q, Ma X, Zhu B, Dong X, Lou Z. Metabonomic identification of the effects of the Zhimu-Baihe saponins on a chronic unpredictable mild stress-induced rat model of depression. *J Pharm Biomed Anal*. 2016; 128: 469-479.
 - 81) Ni Y, Su M, Lin J, Wang X, Qiu Y, Zhao A, Chen T, Jia W. Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model

- of chronic unpredictable mild stress. *FEBS Lett.* 2008; 582(17): 2627-36.
- 82) Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M. Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro. *J Neurochem.* 1992; 59(1): 55-61.
 - 83) Wiame E, Tyteca D, Pierrot N, Collard F, Amyere M, Noel G, Desmedt J, Nassogne MC, Vikkula M, Octave JN, Vincent MF, Courtoy PJ, Boltshauser E, van Schaftingen E. Molecular identification of aspartate N-acetyltransferase and its mutation in hypoacetylaspartia. *Biochem J.* 2009; 425(1): 127-36.
 - 84) Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol.* 2007; 81(2): 89-131.
 - 85) Nakano M, Ueda H, Li JY, Matsumoto M, Yanagihara T. Measurement of regional N-acetylaspartate after transient global ischemia in gerbils with and without ischemic tolerance: an index of neuronal survival. *Ann Neurol.* 1998; 44(3): 334-40.
 - 86) Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry.* 2004; 161(4): 598-607.
 - 87) Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry.* 2004; 56(9): 640-50.
 - 88) Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 2005; 47(6): 803-15.
 - 89) Sibbe M, Kulik A. GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(7): 5497-5510.
 - 90) Banasr M, Lepack A, Fee C, Duric V, Maldonado-Aviles J, DiLeone R, Sibille E, Duman RS, Sanacora G. Characterization of GABAergic marker expression in the chronic unpredictable stress model of depression. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 2017; 1: 10.1177/2470547017720459.
 - 91) U.S. Food and Drug administration. Varenicline (marketed as Chantix) Information.
<https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm106540.htm>.
 - 92) Nemoto T, Ando I, Kataoka T, Arifuku K, Kanazawa K, Natori Y, Fujiwara M. NMR metabolic profiling combined with two-step principal component analysis

- for toxin-induced diabetes model rat using urine. *J Toxicol Sci.* 2007; 32(4): 429-35.
- 93) Tomita S, Nemoto T, Matsuo Y, Shoji T, Tanaka F, Nakagawa H, Ono H, Kikuchi J, Ohnishi-Kameyama M, Sekiyama Y. A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chem.* 2015; 174: 163-72.
 - 94) Rollema H, Guanowsky V, Mineur YS, Shrikhande A, Coe JW, Seymour PA, Picciotto MR. Varenicline has antidepressant-like activity in the forced swim test and augments sertraline's effect. *Eur J Pharmacol.* 2009; 605(1-3): 114-6.
 - 95) Caldarone BJ, Wang D, Paterson NE, Manzano M, Fedolak A, Cavino K, Kwan M, Hanania T, Chellappan SK, Kozikowski AP, Olivier B, Picciotto MR, Ghavami A. Dissociation between duration of action in the forced swim test in mice and nicotinic acetylcholine receptor occupancy with sazetidine, varenicline, and 5-I-A85380. *Psychopharmacology (Berl).* 2011; 217(2): 199-210.
 - 96) Gonzales D, Rennard SI, Nides M, Oncken C, Azoulay S, Billing CB, Watsky EJ, Gong J, Williams KE, Reeves KR; Varenicline Phase 3 Study Group. Varenicline, an $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006; 296(1): 47-55.
 - 97) Freedman R. Exacerbation of schizophrenia by varenicline. *Am J Psychiatry.* 2007; 164(8): 1269.
 - 98) Yousefi MK, Folsom TD, Fatemi SH. A Review of Varenicline's Efficacy and Tolerability in Smoking Cessation Studies in Subjects with Schizophrenia. *J Addict Res Ther.* 2011; S4(1). pii: 3045.
 - 99) U.S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>.
 - 100) Van Zundert RM, Boogerd EA, Vermulst AA, Engels RC. Nicotine withdrawal symptoms following a quit attempt: an ecological momentary assessment study among adolescents. *Nicotine Tob Res.* 2009; 11(6): 722-9.
 - 101) Alemi F, Sullivan T. Tutorial on risk adjusted X-bar charts: applications to measurement of diabetes control. *Qual Manag Health Care.* 2001; 9(3): 57-65.
 - 102) Zvolensky MJ, Bakhshaie J, Sheffer C, Perez A, Goodwin RD. Major depressive disorder and smoking relapse among adults in the United States: a 10-year, prospective investigation. *Psychiatry Res.* 2015; 226(1): 73-7.
 - 103) Jorenby DE, Hatsukami DK, Smith SS, Fiore MC, Allen S, Jensen J, Baker TB. Characterization of tobacco withdrawal symptoms: transdermal nicotine reduces

- hunger and weight gain. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996; 128(2): 130-8.
- 104) Weinberger AH, Krishnan-Sarin S, Mazure CM, McKee SA. Relationship of perceived risks of smoking cessation to symptoms of withdrawal, craving, and depression during short-term smoking abstinence. *Addict Behav*. 2008; 33(7): 960-3.
 - 105) Shiffman S, West R, Gilbert D; SRNT Work Group on the Assessment of Craving and Withdrawal in Clinical Trials. Recommendation for the assessment of tobacco craving and withdrawal in smoking cessation trials. *Nicotine Tob Res*. 2004; 6(4): 599-614.
 - 106) Chellian R, Pandey V, Mohamed Z. Alpha-asarone attenuates depression-like behavior in nicotine-withdrawn mice: Evidence for the modulation of hippocampal pCREB levels during nicotine-withdrawal. *Eur J Pharmacol*. 2018; 818: 10-16.
 - 107) Miyata G, Meguid MM, Varma M, Fetisov SO, Kim HJ. Nicotine alters the usual reciprocity between meal size and meal number in female rat. *Physiol Behav*. 2001; 74(1-2): 169-76.
 - 108) Comstock GW, Stone RW. Changes in body weight and subcutaneous fatness related to smoking habits. *Arch Environ Health*. 1972; 24(4): 271-6.
 - 109) Mannucci C, Navarra M, Calzavara E, Caputi AP, Calapai G. Serotonin involvement in *Rhodiola rosea* attenuation of nicotine withdrawal signs in rats. *Phytomedicine*. 2012; 19(12): 1117-24.
 - 110) Motaghinejad M, Fatima S, Karimian M, Ganji S. Protective effects of forced exercise against nicotine-induced anxiety, depression and cognition impairment in rat. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016; 27(1): 19-27.
 - 111) Kotagale NR, Chopde CT, Umekar MJ, Taksande BG. Chronic agmatine treatment prevents behavioral manifestations of nicotine withdrawal in mice. *Eur J Pharmacol*. 2015; 754: 190-8.
 - 112) Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 1992 Jan 1;281 (Pt 1):21-40.
 - 113) Cunha MP, Martín-de-Saavedra MD, Romero A, Egea J, Ludka FK, Tasca CI, Farina M, Rodrigues AL, López MG. Both creatine and its product phosphocreatine reduce oxidative stress and afford neuroprotection in an in vitro Parkinson's model. *ASN Neuro*. 2014; 6(6).
 - 114) Wang Y, Cai H, Li C, Jiang Z, Wang L, Song J, Xia J. Optimal caliper width for propensity score matching of three treatment groups: a Monte Carlo study. *PLoS*

One. 2013; 8(12): e81045.

- 115) Akimoto H, Oshima S, Ohara K, Negishi A, Hiroshima H, Nemoto T, Kobayashi D. High-Resolution Magic-Angle Spinning-¹H-NMR Spectroscopy-Based Metabolic Profiling of Hippocampal Tissue in Rats with Depression-Like Symptoms. *Biol Pharm Bull*. 2017; 40(6): 789-96.
- 116) Liu W, Sheng H, Xu Y, Liu Y, Lu J, Ni X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. *Behav Brain Res*. 2013; 242: 110-6.
- 117) Zhu X, Xia O, Han W, Shao M, Jing L, Fan Q, Liu Y, Diao J, Lv Z, Sun X. Xiao Yao San Improves Depressive-Like Behavior in Rats through Modulation of β -Arrestin 2-Mediated Pathways in Hippocampus. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014: 902516.
- 118) Qiu FM, Zhong XM, Mao QQ, Huang Z. Antidepressant-like effects of paeoniflorin on the behavioural, biochemical, and neurochemical patterns of rats exposed to chronic unpredictable stress. *Neurosci Lett*. 2013; 541: 209-13.
- 119) Kalueff AV, Tuohimaa P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol*. 2005; 508(1-3): 147-53.
- 120) Sun L, Li J, Zhou K, Zhang M, Yang J, Li Y, Ji B, Zhang Z, Zhu H, Yang L, He G, Gao L, Wei Z, Wang K, Han X, Liu W, Tan L, Yu Y, He L, Wan C. Metabolomic analysis reveals metabolic disturbance in the cortex and hippocampus of subchronic MK-801 treated rats. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60598.
- 121) Lan MJ, McLoughlin GA, Griffin JL, Tsang TM, Huang JT, Yuan P, Manji H, Holmes E, Bahn S. Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2009; 14(3): 269-79.
- 122) Balaji M, Appa Rao KM, Ramakrishna K, Srinivasarao. Development and validation of related substances method for Varenicline and its impurities. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(1): 304-9.
- 123) Kadi AA, Mohamed MS, Kassem MG, Darwish IA. A validated stability-indicating HPLC method for determination of varenicline in its bulk and tablets. *Chem Cent J*. 2011; 5: 30.
- 124) Goldston DB, Daniel SS, Erkanli A, Reboussin BA, Mayfield A, Frazier PH, Treadway SL. Psychiatric diagnoses as contemporaneous risk factors for suicide attempts among adolescents and young adults: developmental changes. *J Consult Clin Psychol*. 2009; 77(2): 281-90.

- 125) Oquendo MA, Galfalvy H, Russo S, Ellis SP, Grunebaum MF, Burke A, Mann JJ. Prospective study of clinical predictors of suicidal acts after a major depressive episode in patients with major depressive disorder or bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2004; 161(8): 1433-41.
- 126) Banda JM, Evans L, Vanguri RS, Tatonetti NP, Ryan PB, Shah NH. A curated and standardized adverse drug event resource to accelerate drug safety research. *Sci Data*. 2016; 3: 160026.
- 127) Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A. Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature*. 1998; 393(6680): 76-9.